



Ricardo Jorge Rodrigues Matos

Licenciado em Ciências da Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de membranas magnéticas para tratamento de cancro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, PhD, DCM FCT-UNL

Co-orientadora: Doutora Paula Isabel Pereira Soares, PhD, DCM – FCT/UNL



Setembro, 2017

Desenvolvimento de membranas magnéticas para tratamento de cancro

Copyright © Ricardo Jorge Rodrigues Matos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collie

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer as três pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais e o meu irmão. Aos meus pais agradeço todo o seu esforço, dedicação, amor e altruísmo, que sempre demonstraram em toda a minha vida, sem eles nada teria sido possível. Não menos importante, o meu irmão, que com o seu jeito carinhoso sempre se mostrou motivador e presente quer meu percurso académico, quer na minha vida. É o meu mano.

Agradeço ao Prof. Dr. João Paulo Borges pela forma motivadora e confiança com que me aceitou para ser seu aluno a orientar. Assim como agradeço toda a sua ajuda, tempo dispensado e conhecimentos transmitidos.

À minha co-orientadora, a Dra Paula Soares, por toda a sua orientação, no sentido literal da palavra. Sempre com muita paciência, disponibilidade e prontidão, mesmo com as dificuldades de estar a atravessar uma gravidez. Sempre proporcionou um ambiente descontraído e de união no laboratório, propício ao desenvolvimento de um bom trabalho.

À Professora Susete, ao Professor João Canejo e a Dra. Ana Baptista que sempre se mostraram disponíveis para ajudar, mostrando a simpatia enorme que os caracteriza.

Aos meus colegas de laboratório, Adriano, Catarina, Miguel, Paula e Renato, com quais partilhei o dia a dia. Partilhámos também muitas experiências, sempre com entreaajuda de quem sabia o receio existente de que algo corresse menos bem.

Não posso também deixar de agradecer à técnica do laboratório, a D. Augusta, pois manteve a ordem no laboratório e sempre partilhou o seu tempo com os alunos.

Aos amigos que a FCT colocou na minha vida, em especial à Ana Fouto, à Catarina Pinheiro, à Cristina Palma, ao Miguel Fernandes e à Paula Martins, não esquecendo os outros amigos menos próximos e os colegas de curso que foram muito importantes na conclusão desta etapa.

Aos amigos de sempre – Marcelito, Gabriela, Luís Carlos, Laura- que sempre estiveram disponíveis para ajudar naquilo que podiam e até mesmo no que não podiam. Sei que posso contar com vocês, e isso é importante para mim! Ao Alexandre Moreira, um agradecimento especial, tive o prazer de ter por perto um amigo, um colega de casa, um colega de faculdade e um “irmão”, todos eles encarados na mesma pessoa. Foram os dois melhores anos de faculdade, sempre com uma boa

disposição mesmo quando parecia nem haver tempo para respirar. Um obrigado do fundo do coração.

À minha avó Maria, por tudo o que lhe devo, uma verdadeira avó, uma verdadeira motivação, uma lição de vida.

Aos meus segundos pais, tio Jorge e tia Paula, e aos meus “irmãos emprestados” - João e Márcia – por me mostrarem uma verdadeira união e sempre me darem força para ir mais além.

Um obrigado também ao tio Luís e ao meu Padrinho, que mesmo estando distantes sempre se mostraram presentes.

Por último, mas não menos importante, à Vitória por estar sempre comigo, mesmo que essa presença nem sempre seja física.

Resumo

A hipertermia é um tipo de tratamento de cancro, no qual tecido corporal é exposto a altas temperaturas (cerca de 42.5 °C). Recentemente, a hipertermia aplicada através do uso de nanopartículas magnéticas (MNPs), as quais podem gerar calor através da aplicação de um campo magnético alternado, tem sido usada como uma nova forma de terapia do cancro - hipertermia magnética. A incapacidade da hipertermia magnética se assumir como a terapia convencional para o tratamento do cancro, está relacionada com a citotoxicidade das MNPs para altas concentrações, e a incapacidade de direcionar as MNPs ao tumor.

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver membranas de acetato de celulose (AC) através da técnica de eletrofiação, e incorporar MNPs quer através de adsorção, quer pela sua adição à solução precursora de eletrofiação. A finalidade das membranas é que possam ser utilizadas no tratamento de cancro por hipertermia magnética, permitindo que as MNPs se concentrem na região do tumor.

As MNPs foram sintetizadas por precipitação química e estabilizadas com ácido oleico (AO) ou ácido dimercaptosuccínico (DMSA) para evitar a sua agregação. A estabilidade das nanopartículas foi comprovada por DLS (dispersão dinâmica de luz), enquanto a análise de FTIR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) mostrou a sua ligação ao AO ou ao DMSA. Os resultados de TEM (microscopia eletrónica de transmissão) mostraram que o tamanho médio do diâmetro do núcleo das nanopartículas ronda os 10 nm, e a análise VSM (magnetómetro de amostra vibrante) confirmou as propriedades superparamagnéticas das MNPs. O padrão de DRX (difração de raios-X) refletiu a presença de uma estrutura cristalina de magnetite em todas as nanopartículas. A incorporação de MNPs na matriz polimérica foi confirmada por TEM, e corroborada pela análise EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios-X).

Os ensaios de hipertermia provaram que algumas membranas têm a capacidade de atingir as temperaturas pretendidas. No entanto, os ensaios de citotoxicidade revelaram que existe um compromisso com a quantidade de MNPs utilizadas.

Palavras-chave: Hipertermia magnética, nanopartículas superparamagnéticas, acetato de celulose, nanocompósitos magnéticos.

Abstract

Hyperthermia is a type of cancer treatment in which the body tissue is exposed to high temperatures (42.5 °C). Recently, hyperthermia using magnetic nanoparticles (MNPs) that can generate heat by the application of an alternating magnetic field, has been used as a novel cancer therapy – named magnetic hyperthermia. The primary reasons for magnetic hyperthermia's inability to enter mainstream cancer therapy have been the cytotoxicity of MNPs at high concentrations, and their inability to directly target tumor cells.

The main purpose of this work was to develop cellulose acetate (AC) membranes through the electrospinning technique, with incorporated MNPs, either through adsorption or by their addition in the electrospinning solution. The main application of such membranes is to be used in cancer treatment through magnetic hyperthermia, generating a high concentration of nanoparticles near to tumor site.

MNPs synthesized by chemical precipitation were stabilized either with oleic acid (AO) or dimercaptosuccinic acid (DMSA) to prevent their aggregation. The nanoparticles stability was confirmed by DLS (dynamic light scattering), while FTIR analysis (Fourier transform infrared spectroscopy) showed their bonding to OA, or DMSA. The TEM (transmission electron microscopy) results allowed to know the size of the nanoparticles core, which was about 10 nm, and VSM (vibrating sample magnetometer) analysis confirmed the superparamagnetic properties of MNPs. The pattern of XRD (X-ray diffraction) reflected the presence of a crystalline structure of magnetite in all nanoparticles. The incorporation of MNPs into a polymer matrix was confirmed by TEM and was further corroborated by EDS (energy dispersive spectroscopy) analysis.

Hyperthermia assays showed that some membranes have the capacity to reach the desired temperatures. However, cytotoxicity assays revealed that there is a compromise to the amount of MNPs used and the generated heat.

Keywords: Magnetic hyperthermia, superparamagnetic nanoparticles, cellulose acetate, magnetic nanocomposites.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XXI
ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS.....	XXIII
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	1
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	3
3 ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	5
3.1 TIPOS DE MAGNETISMO NOS MATERIAIS	5
3.1.1 <i>Ferromagnetismo</i>	6
3.1.2 <i>Diamagnetismo</i>	6
3.1.3 <i>Antiferromagnetismo</i>	6
3.1.4 <i>Paramagnetismo</i>	7
3.1.5 <i>Ferrimagnetismo</i>	7
3.1.6 <i>Propriedades magnéticas</i>	7
3.1.7 <i>Comportamento superparamagnético</i>	9
3.2 NANOPARTÍCULAS	11
3.2.1 <i>Nanopartículas magnéticas</i>	13
3.2.1.1 <i>Hipertermia magnética baseada em MNPs</i>	13
3.3 MAGNETITE	15
3.3.1 <i>Estrutura e propriedades</i>	15
3.3.2 <i>Métodos de síntese</i>	16
3.3.2.1 <i>Precipitação química</i>	16
3.3.3 <i>Estabilização</i>	17
3.4 NANOFIBRAS	18
3.4.1 <i>Eletrofiação</i>	19
2.5.1.1. <i>Parâmetros de controlo</i>	20
2.5.1.2. <i>Compósitos poliméricos magnéticos</i>	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	25
4.1.1 <i>Síntese</i>	25

Materiais:	25
Procedimento:	26
4.1.2 <i>Determinação da concentração de ferro</i>	26
Materiais.....	26
Procedimento.....	26
4.1.3 <i>Estabilização</i>	27
4.1.3.1 Revestimento com ácido oleico	27
4.1.3.2 Revestimento com DMSA	28
4.1.4 <i>Caracterização</i>	28
4.1.4.1 Difração de Raios-X	28
4.1.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	28
4.1.4.3 Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)	29
4.1.4.4 Análise da morfologia por TEM.....	29
4.1.4.5 Propriedades magnéticas	30
4.2 ELETROFIAÇÃO	30
4.2.1 <i>Equipamento</i>	30
4.3 ADSORÇÃO DAS NPS	31
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	31
4.4.1 <i>Microscopia eletrônica de varrimento - SEM</i>	31
4.4.2 <i>Espectroscopia de energia dispersiva - EDS</i>	31
4.4.3 <i>Ensaio de tração</i>	32
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	32
4.5.1 <i>Citotoxicidade</i>	32
4.5.2 <i>Procedimento</i>	33
4.6 ENSAIOS DE HIPERtermia Magnética.....	34
5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	35
5.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	35
5.1.1 <i>Caracterização estrutural e morfológica</i>	35
5.1.1.1 Difração de Raios-X	35
5.1.1.2 FTIR.....	37
5.1.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão	39
5.1.1.4 Diâmetro hidrodinâmico das MNPs	41
5.1.1.5 Propriedades magnéticas	44
5.2 MEMBRANAS PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO	46
5.2.1 <i>Determinação dos parâmetros de produção</i>	46
5.2.2 <i>Adsorção das MNPs à membrana</i>	49
5.2.3 <i>Eletrofiação coloidal</i>	53

5.2.4	<i>Ensaio de tração</i>	55
5.3	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	58
5.4	ENSAIOS DE HIPERTERMIA MAGNÉTICA.....	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6.1	CONCLUSÕES	63
6.2	SUGESTÃO DE INVESTIGAÇÃO FUTURA.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Lista de Figuras

Figura 3.1-Resposta a um campo magnético para os diferentes tipos de materiais [13].....	5
Figura 3.2-Magnetização em função da temperatura [14]	8
Figura 3.3-Curva de histerese [15].....	9
Figura 3.4-Ilustração qualitativa da coercividade em função do tamanho da partícula [15].	10
Figura 3.5-Esquemático para a classificação dos diferentes nanosistemas [4].....	12
Figura 3.6 Influência da hipertermia na regressão de um tumor [21].....	13
Figura 3.7-Estrutura da magnetite (as esferas a preto representam Fe II, a verde representam Fe III e as esferas a vermelho representam o oxigénio) [23].	16
Figura 3.8- Representação esquemática do processo de eletrofiação [6].	19
Figura 3.9- Evolução da forma da gota, no processo de formação do jato. O tempo 0 ms corresponde ao início do jato [28].....	20
Figura 4.1-Distribuição da sementeira de células nas duas placas de 96 poços, utilizadas para efetuar os ensaios de citotoxicidade.	34
Figura 5.1-Padrão de difração de Raios-X das nanopartículas sintetizadas por precipitação química, sem qualquer agente estabilizador.....	36
Figura 5.2- Difrátograma de raios-X de (a) NPs sintetizadas por precipitação química, sem qualquer revestimento (b) NPs revestidas com ácido oleico 64 mM (c) NPs revestidas com ácido dimercaptosuccínico- DMSA com um rácio de 4% em relação ao número de moles de ferro em solução.....	37
Figura 5.3-Espectro de FTIR para as NPs sintetizadas por precipitação química sem qualquer revestimento.	38
Figura 5.4- Esquema representativo da ligação entre Fe_3O_4 e o ácido oleico.....	38
Figura 5.5- Espectros de FTIR para (preto) magnetite sem qualquer revestimento (vermelho) magnetite revestida com AO (azul) magnetite revestida com DMSA.	39
Figura 5.6- Imagem TEM da magnetite sem revestimento e respetiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.	40

Figura 5.7-Imagem TEM da magnetite revestida com ácido oleico e respetiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.	41
Figura 5.8- Imagem TEM da magnetite revestida com DMSA e respetiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.....	41
Figura 5.9- Curvas experimentais (pontos) obtidas através da técnica de dispersão dinâmica da luz para nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com DMSA (azul) e ácido oleico (vermelho) e respetivas curvas de autocorrelação ajustadas (tracejado).	42
Figura 5.10- Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) calculados para soluções de NPs revestidas com ácido oleico a diferentes concentrações.....	43
Figura 5.11- Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) calculados para soluções de NPs revestidas com DMSA a diferentes concentrações.	43
Figura 5.12-Magnetização em função do campo aplicado, para NPs de magnetite à temperatura de 10 K (vermelho) e a 320 K (preto).	45
Figura 5.13-Curvas de magnetização a 320 K para NPs de magnetite (preto), NPs de magnetite revestidas com AO (vermelho) e revestidas com DMSA (azul).....	46
Figura 5.14-Fotografias resultantes da observação ao microscópio ótico de fibras resultantes do processo de eletrofiação, com ampliação de x20 (esquerda) e ampliação x50 (direita). Tensão aplicada de 20 kV; distância agulha-coletor de 11 cm; humidade a 41%; temperatura a 21 °C; caudal igual a 0.15 ml/h.	47
Figura 5.15-Imagem SEM de fibras produzidas por eletrofiação para as condições da amostra A10 (humidade de 40%; caudal de 0.15 ml/h; distância agulha-coletor igual a 17 cm; potencial aplicado de 20 kV) e respetiva distribuição de diâmetros.	49
Figura 5.16- Resultado após as membranas de AC estarem 24 horas em adsorção em soluções com diferentes concentrações de NPs-AO.....	50
Figura 5.17- Resultado após as membranas de AC estarem 24 horas em adsorção em soluções de NPs com diferentes revestimentos (DMSA e AO) mas com a mesma concentração.....	51
Figura 5.18- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de $[\text{NPs} - \text{AO}] = 0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$	51
Figura 5.19- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de $[\text{NPs} - \text{AO}] = 2.0 \text{ mg.ml}^{-1}$	51

Figura 5.20- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de [NPs - DMSA] = 0.5 mg.ml ⁻¹	52
Figura 5.21- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de [NPs - DMSA] = 2.0 mg.ml ⁻¹	52
Figura 5.22- Análise EDS para membranas de AC após adsorção numa solução de (A) NPs - AO com concentração de 6.34 mg.ml ⁻¹ (B) NPs - DMSA com concentração de 1.0 mg.ml ⁻¹	53
Figura 5.23-Imagem SEM para eletrofição com NPs-AO na solução precursora e respetiva distribuição de diâmetros. Condições: 25.8 °C; humidade 44%; caudal de 0.25 mg.ml ⁻¹ ; distância agulha-coletor de 20 cm; potencial de 20 kV.	55
Figura 5.24- Imagens TEM para fibras de AC com incorporação de NPs-AO (esquerda) e NPs-DMSA (direita).	55
Figura 5.25- Curvas de tração para os vários tipos de membranas de AC: AC 12% m/m; AC com NPs-AO ou NPs-DMSA na solução precursora de eletrofição; AC em adsorção em soluções de NPs-AO ou NPs-DMSA com diferentes concentrações. As curvas representam uma média dos 10 ensaios realizados para cada tipo de membrana.	56
Figura 5.26- Diferentes parâmetros calculados para cada tipo de membrana: módulo de Young (preto), tensão de rotura (vermelho) e tensão limite de elasticidade (azul).	57
Figura 5.27- Viabilidade celular de células Vero após 24 h de exposição aos vários tipos de membranas: AC 12% m/m; AC com NPs-AO ou NPs-DMSA na solução precursora de eletrofição; AC em adsorção em soluções de NPs-AO ou NPs-DMSA com diferentes concentrações.....	59
Figura 5.28- Variação de temperatura para os vários tipos de membranas de AC com MNPs incorporadas quer por adsorção, quer por adição à solução precursora de eletrofição. Os ensaios foram realizados durante 10 minutos para uma densidade de fluxo magnético de 300 Gauss.	61

Lista de Tabelas

Tabela 3.1-Variáveis do processo de eletrofiação [29].	21
Tabela 5.1-Amostras que foram selecionadas para observação por SEM.	48
Tabela 5.2-Diâmetros médios das fibras das amostras selecionadas para SEM.	49
Tabela 5.3- Parâmetros ótimos para eletrofiação com a incorporação de NPs-AO e NPs-DMSA na solução precursora.....	54
Tabela 5.4- Diâmetro médio das fibras para os vários tipos de membranas submetidas aos ensaios de tração.	58

Acrónimos e Símbolos

AC	Acetato de celulose
Ads	Adsorção
AO	Ácido oleico
D _H	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DRX	Difração de raios-X
E	Módulo de Young
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
H _c	Coercividade
IONPs	Nanopartículas de óxidos de ferro
ISO	Organização internacional de normalização
MNPs	Nanopartículas magnéticas
M _r	Magnetização remanescente
M _s	Magnetização de saturação
NPs	Nanopartículas
NPs-AO	Nanopartículas revestidas com ácido oleico
NPs-DMSA	Nanopartículas revestidas com ácido dimercaptosuccínico
SAR	Taxa de absorção específica
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
S. Perc.	Solução percursora
SQUID	<i>Superconducting Quantum Interference Device</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
UV	Ultravioleta
VIS	Radiação visível
VSM	Magnetómetro de amostra vibrante

σ_{LE}	Tensão limite de elasticidade
σ_{ROT}	Tensão de rotura

1 Contextualização

O cancro é uma doença na qual as células do nosso organismo, por terem sofrido mutações no seu ADN, dividem-se sem controlo e invadem os tecidos adjacentes, promovendo a sua destruição. As células cancerígenas podem-se espalhar para outros locais do corpo, através dos sistemas circulatório e linfático, dando origem a metástases [1]. A carcinogénese é o processo pelo qual se dá origem a uma célula cancerígena.

A ocorrência de cancro está a aumentar devido ao aumento e envelhecimento da população, assim como um aumento de fatores de risco para a saúde, tais como o tabagismo, má alimentação, inatividade física e a alteração dos padrões de reprodução (incluindo uma idade mais avançada para ter o primeiro filho) associados à urbanização e ao desenvolvimento económico. Com base em estimativas do GLOBOCAN, ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de óbitos devido ao cancro, só no ano de 2012 em todo o mundo [2].

A radioterapia e a quimioterapia assumem-se como os tratamentos convencionais do cancro, e são baseadas no uso de radiação ionizante para destruir o tecido tumoral. O principal desafio destas formas de terapia é evitar a exposição dos tecidos saudáveis que envolvem o tumor, uma vez que estes tipos de tratamento são realizados à escala do tecido ou órgão em questão, e não a nível celular. No entanto, todas as técnicas de delimitação do volume para tratamento, inevitavelmente, envolvem tecidos saudáveis [3].

Outros tipos de terapia podem ser aplicados, o *National Cancer Institute* dos Estados Unidos define a hipertermia como um tratamento no qual o tecido corporal é exposto a altas temperaturas (cerca de 42.5 °C), com intuito de danificar ou matar as células cancerígenas, podendo também torná-las mais sensíveis aos efeitos da radiação. A hipertermia permite aumentar o fornecimento de sangue ao tumor, o que por sua vez aumenta localmente os níveis de oxigênio. A eficácia da radioterapia depende da formação de radicais livres de oxigênio. Deste modo, a hipertermia pode aumentar a eficácia da radiação ao aumentar a formação de radicais livres [2-4].

A utilização da técnica de hipertermia no tratamento do cancro, pode ser vista como uma abordagem promissora, uma vez que pode resultar em menos efeitos colaterais para os tecidos saudáveis, quando comparada com a radioterapia ou quimioterapia. A maior dificuldade técnica deste tipo de terapia, também se prende com o facto de ser difícil aplicar um aumento de temperatura localizado, isto é, apenas na região do tumor [5]. Nesse âmbito, o uso de nanopartículas magnéticas (MNPs) introduz uma solução inovadora para a realização de hipertermia magnética. O aquecimento é induzido através da aplicação de um campo magnético alternado. Um fator importante para determinar a eficiência desta técnica é a habilidade das MNPs atingirem e acumularem-se na região do tumor [3]. A aplicação de MNPs livres em hipertermia, tem várias limitações devido a baixa solubilidade, a pobre biomarcação das células alvo, e a libertação de MNPs a partir da localização do tumor. Portanto, uma solução possível passa por incorporar as MNPs em matrizes de nanofibras produzidas por eletrofiação, que podem ser introduzidas na região do tumor por endoscopia ou cirurgia [6]. Este método é particularmente promissor, desde que se controle não só o tamanho das nanopartículas (NPs), mas também o seu arranjo espacial [7].



2 Revisão da Bibliografia

Neste capítulo pretende-se apresentar estudos que já foram efetuados, nomeadamente, acerca de matrizes poliméricas funcionalizadas com magnetite, no âmbito de serem aplicadas em hipertermia magnética.

Num estudo efetuado por Amarjargal e a sua equipa, nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 foram sintetizadas por um método de precipitação modificado seguido de um tratamento hidrotérmico. Depois foram imobilizadas em nanofibras de poliuretano (PU), através da imersão em solução de poliol sem a necessidade de qualquer agente de ligação ou surfactante, exceto uma solução quente de etilenoglicol. As nanomembranas apresentaram uma magnetização de saturação elevada e um efeito de aquecimento notável aquando da aplicação de um campo magnético alternado, com potencial para aplicação no tratamento por hipertermia [8].

Outro estudo também provou que matrizes de nanofibras de policaprolactona (PCL) com magnetite incorporada apresentam boas propriedades de aquecimento na presença de um campo magnético alternado. Demonstrou-se especificamente um novo conceito para a produção de materiais, onde as nanopartículas magnéticas incorporadas nas nanofibras poliméricas, podem ser utilizadas para fundir um polímero circundante, a partir do calor gerado. Assim, utilizar uma membrana magnética interna, para unir duas camadas de polímero não magnético em conjunto, numa estrutura tipo sandwich, sem a necessidade de qualquer agente de ligação ou tensioativo. Além disso, as matrizes

preparadas são biocompatíveis e biodegradáveis, uma vez que tanto a PCL como a magnetite não são tóxicos [9].

Também o quitosano pode ser o polímero de suporte para a magnetite. Esta hipótese foi estudada, incorporando as nanopartículas de magnetite no quitosano através de diferentes métodos de preparação. As experiências de aquecimento indicaram que estes compósitos, funcionalizados magneticamente, podem aumentar a temperatura da solução até 45°C por aplicação de um campo magnético alternado. Os compósitos não apresentaram citotoxicidade. Concluiu-se ainda que o calor gerado por estes compostos magnéticos de nanofibras, quando estão na presença de um campo magnético alternado, podem reduzir significativamente a taxa de proliferação/crescimento de células malignas. Assim, têm grande potencial para terapia hipertérmica do cancro, quer através de entrega endoscópica quer através de entrega cirúrgica [1].

Outro estudo, utilizando quitosano, onde a magnetite foi incorporada nas nanofibras através do processo de adsorção, também permitiu concluir que estes compósitos de nanofibras magnéticas podem ser potencialmente utilizados para terapia de cancro. Além disso, a introdução da funcionalidade IDA (ácido iminodiacético) na estrutura de quitosano pode aumentar eficazmente a quantidade de nanopartículas magnéticas nos compósitos. Também a taxa de proliferação crescimento de células malignas foi amplamente reduzida com o calor gerado por estas nanomembranas magnéticas após aplicação de um campo magnético alternado [10].

Ainda outro estudo com fibras à base de alginato (SA) foi efetuado. As nanofibras foram tratadas por um método de reticulação iónico ou covalente, seguido da quelação com $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para a co-precipitação química de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 . Foi observada uma citotoxicidade significativamente menor em ambos os extratos líquidos das membranas magnéticas, quer reticuladas por ligações iónicas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/PEO}$) quer reticuladas por ligações covalentes ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/PVA}$). O ensaio de hipertermia *in vitro* indicou que as matrizes baseadas em alginato magnético, reticulado por ligações covalentes, reduzem a viabilidade das células tumorais mais eficazmente do que apenas as nanopartículas de Fe_3O_4 [11].

3 Enquadramento Teórico

Neste capítulo, exploram-se alguns conceitos teóricos importantes, mais especificamente, em relação à produção de membranas de acetato de celulose (AC) e a sua funcionalização com nanopartículas magnéticas, para que possam ser aplicadas em hipertermia magnética.

3.1 Tipos de magnetismo nos materiais

Os materiais podem ser organizados em diferentes tipos, como ferromagnético, diamagnético, paramagnético, ferrimagnético, antiferromagnético, entre outras, dependendo da sua resposta a um campo magnético externo aplicado [12][13].

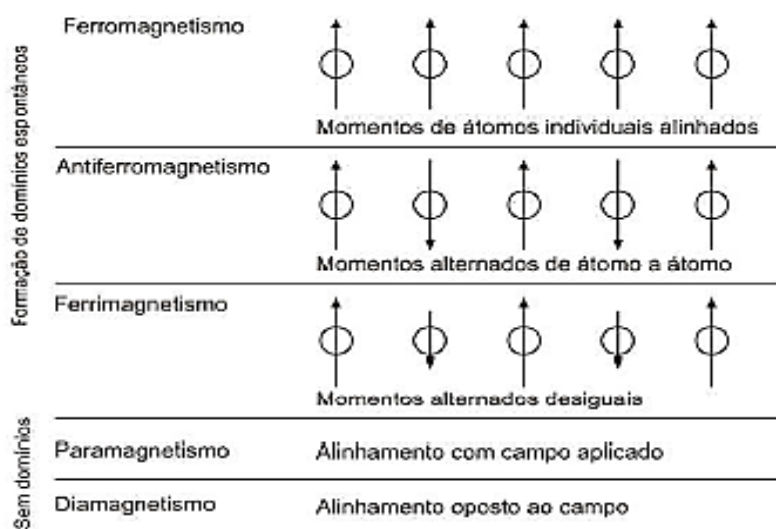


Figura 3.1-Resposta a um campo magnético para os diferentes tipos de materiais [13].

A figura 3.1 resume a resposta magnética de diferentes tipos de materiais a um campo magnético externo. Essa resposta será explicada nos subcapítulos seguintes.

3.1.1 Ferromagnetismo

Em materiais ferromagnéticos, tais como ferro, níquel e cobalto, um átomo tem um momento magnético resultante devido a elétrons desemparelhados. Os materiais são compostos por domínios, os átomos presentes em cada domínio têm um momento magnético paralelo, produzindo um momento magnético resultante para o domínio. No entanto, os momentos magnéticos de cada domínio estão distribuídos aleatoriamente, resultando num momento magnético total nulo. Quando este tipo de material é colocado num campo magnético, os momentos magnéticos dos domínios alinham-se e formam um grande momento magnético resultante. Um momento magnético residual existe mesmo depois do campo ser removido [12][13].

3.1.2 Diamagnetismo

Em materiais diamagnéticos, tais como o cobre, ouro, prata e a maioria dos elementos conhecidos, os átomos não têm elétrons desemparelhados, isto é, os átomos têm as respectivas camadas eletrônicas todas preenchidas, resultando num momento magnético resultante nulo. Estes materiais exibem uma resposta muito fraca, quando estão sob um campo magnético aplicado, e a sua direção é oposta ao campo magnético aplicado. Este tipo de materiais não retêm o momento magnético quando o campo magnético é removido [12][13].

3.1.3 Antiferromagnetismo

Materiais antiferromagnéticos, tais como MnO , CoO e CuCl_2 , são compostos por dois átomos diferentes, que por sua vez ocupam diferentes posições na rede. Os dois átomos têm momentos magnéticos que são iguais em magnitude e opostos na direção, assim o momento magnético resultante é nulo [12].

Os materiais antiferromagnéticos ostentam temperatura crítica, intitulada temperatura de Néel. Acima da temperatura de Néel, o material exibe o comportamento paramagnético, tal como explicado no subcapítulo Propriedades magnéticas [13].

3.1.4 Paramagnetismo

Em materiais paramagnéticos, como é o caso do gadolínio, magnésio, lítio e tântalo, um átomo tem um momento magnético resultante devido a elétrons não emparelhados, mas os domínios estão ausentes. Quando um material paramagnético é colocado num campo magnético, os momentos magnéticos de cada átomo alinham-se com o campo magnético, formando um momento magnético fraco. Estes materiais não retêm o momento magnético quando o campo é removido [12][13].

3.1.5 Ferrimagnetismo

Os materiais ferrimagnéticos, tais como a magnetite (Fe_3O_4) e a magmite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), são também compostos por diferentes átomos, que se apresentam em diferentes locais da rede, com momentos magnéticos antiparalelos. No entanto, nestes materiais os momentos magnéticos não se anulam, devido ao facto de terem magnitudes diferentes, que origina um momento magnético espontâneo resultante. Os materiais ferrimagnéticos também apresentam temperatura crítica, denominada temperatura de Curie (T_c), acima da qual assumem um comportamento paramagnético. Convém ainda salientar que, tanto os materiais ferrimagnéticos como antiferromagnéticos apresentam um comportamento semelhante aos ferromagnéticos quando sujeitos a um campo magnético [12][13].

3.1.6 Propriedades magnéticas

Tal como referido anteriormente, um material ferromagnético, quando se tem em conta a sua escala macroscópica, é composto por pequenas regiões, chamadas de domínios magnéticos. Esses domínios resultam de um equilíbrio entre diferentes termos de energia: energia de troca (do inglês, *exchange energy*), anisotropia magnetocristalina e energia magnetostática (ou dipolar). A energia de troca tenta alinhar todos os momentos

magnéticos na mesma direção, a anisotropia magnetocristalina tenta orientar momentos magnéticos ao longo de direções específicas e a energia magnetostática tenta eliminar a magnetização no material. Em cada domínio, os momentos magnéticos dos átomos estão alinhados em uma determinada direção, dando uma magnetização resultante a cada domínio. As direções de magnetização dos domínios são diferentes. Assim, a magnetização resultante de um material magnético é explicada pela adição das diferentes magnetizações de todos os domínios [12].

Quando a interação entre os momentos magnéticos é forte o suficiente para se sobrepor à agitação térmica, os momentos magnéticos tendem a ficar alinhados coletivamente, resultando numa magnetização. É esta magnetização que determina a resposta macroscópica de um material quando está submetido a campos magnéticos externos. No entanto, se a temperatura é aumentada, a desordem térmica aumenta e a magnetização diminui, tendendo bruscamente para zero numa temperatura de transição T_c , tal como é representado na figura 3.2. Acima de T_c , o sistema passa da fase ordenada (momentos magnéticos alinhados) para a fase paramagnética, sofrendo assim uma transição de fase [14].

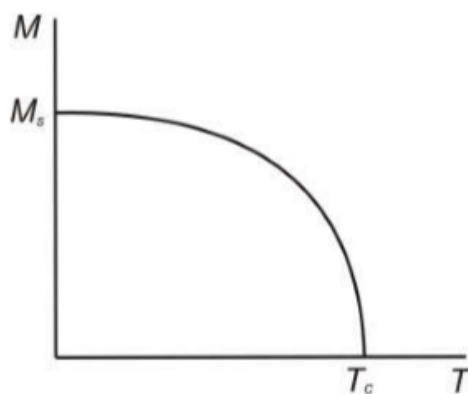


Figura 3.2-Magnetização em função da temperatura [14]

Uma maneira de estudar os processos de magnetização num material ferromagnético passa por aplicar um campo magnético externo variável, e acompanhar o comportamento da magnetização total do material à medida que o campo aplicado se altera. Pode-se então traçar uma curva de magnetização do material em função do campo aplicado. Esta curva será uma somatória de todos os processos reversíveis e irreversíveis de magnetização que vão ocorrendo à medida que o campo varia. Essa

curva denomina-se por curva de histerese e encontra-se representada na figura 3.3. O valor máximo da magnetização alcançado é chamado de magnetização de saturação, M_s . À medida que a magnitude do campo aplicado diminui, os *spins* deixam de estar alinhados com o campo e a magnetização total diminui. Nos materiais ferromagnéticos, um momento magnético residual permanece mesmo quando o campo aplicado é zero. O valor dessa magnetização é denominado de magnetização remanescente, M_r . A razão entre a magnetização remanescente e a magnetização de saturação, M_r/M_s é chamada de razão de remanescência, e varia de 0 a 1. O campo coercivo ou coercividade H_c é a magnitude do campo que deve ser aplicado na direção negativa para trazer a magnetização da amostra de volta a zero. Caso os processos reversíveis dominem, os valores de H_c e M_r aproximam-se de zero [14][15].

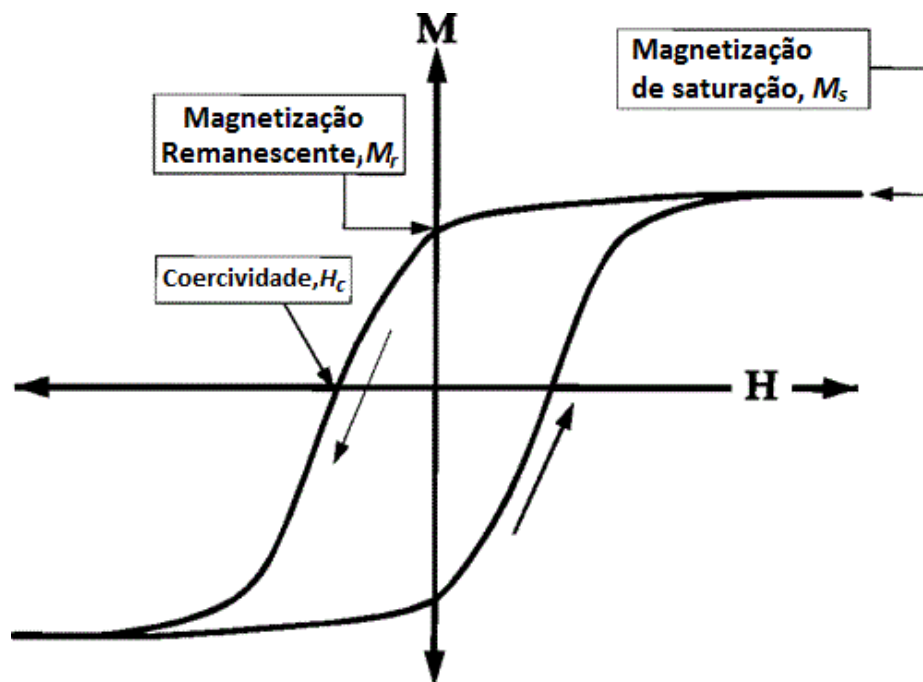


Figura 3.3-Curva de histerese [15].

3.1.7 Comportamento superparamagnético

Nem todas as partículas são constituídas por múltiplos domínios. A investigação experimental acerca da dependência da coercividade em função do tamanho das partículas mostra um comportamento semelhante ao esquematicamente ilustrado na figura 3.4. Em partículas grandes, considerações energéticas favorecem a formação de domínios. À medida que o tamanho das partículas diminui atinge-se um diâmetro

crítico, D_c , de algumas dezenas de nanômetros, e a formação de domínios torna-se energeticamente desfavorável, uma vez que é mais difícil criar uma parede entre domínios do que suportar a energia magnetostática. Assim, abaixo do diâmetro crítico as partículas possuem um domínio único. Para estas partículas, mudanças na magnetização já não podem ocorrer através do movimento das paredes dos domínios, em vez disso, exige-se a rotação coerente dos *spins*, resultando em coercividades maiores. À medida que o tamanho de partícula continua a diminuir, os *spins* são cada vez mais afetados pelas flutuações térmicas e o sistema torna-se superparamagnético [12][15].

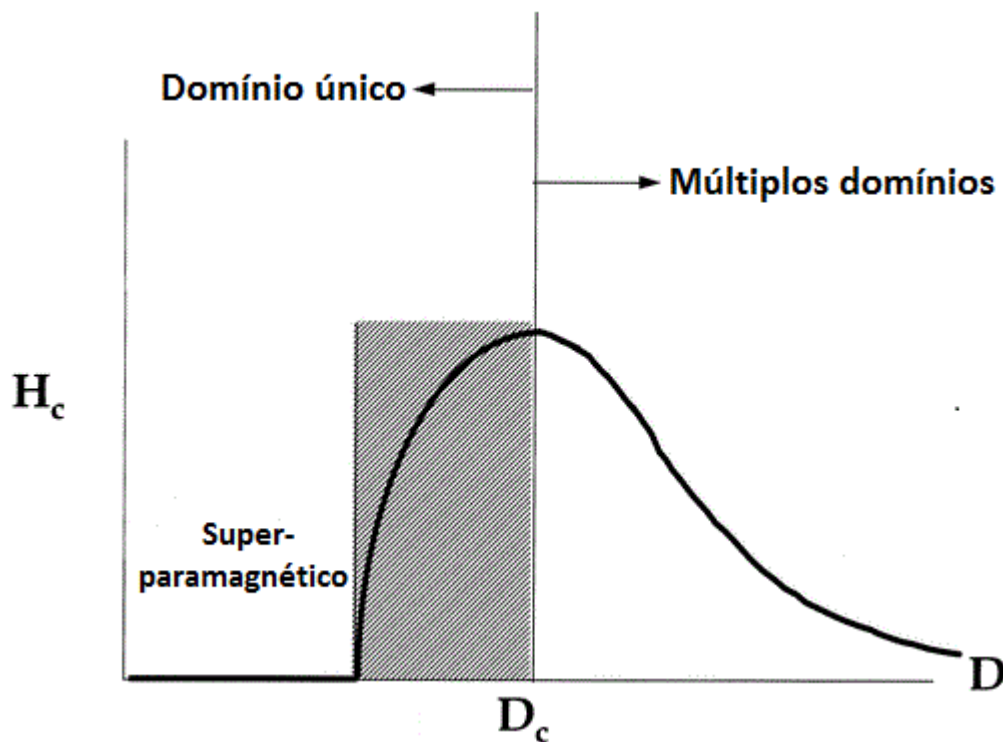


Figura 3.4-Ilustração qualitativa da coercividade em função do tamanho da partícula [15].

Além do tamanho, para que as partículas exibam um comportamento superparamagnético, é necessário que a temperatura esteja acima de uma temperatura

específica, que se denomina temperatura de bloqueio, T_B (do inglês, *blocking temperature*) definida pela Eq. 3.1:

$$K = 25k_B \frac{T_B}{V} \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde K é a constante de anisotropia magnética, k_B é a constante de Boltzmann e V é o volume de uma nanopartícula.[16]

No estado superparamagnético, os momentos magnéticos das nanopartículas flutuam em torno de um eixo de magnetização. Assim, cada uma das MNPs possuirá um grande momento magnético que muda continuamente de orientação. Quando um campo magnético é aplicado, as MNPs no estado superparamagnético exibem uma resposta rápida às mudanças do campo magnético sem magnetização remanescente e sem coercividade. Assim, no estado superparamagnético, uma MNP comporta-se como um átomo paramagnético com um *spin* gigante. A temperaturas abaixo da temperatura de bloqueio, a agitação térmica torna-se pequena e não será capaz de causar flutuações nas orientações dos momentos magnéticos das nanopartículas onde “congelam” em orientações aleatórias [12].

O comportamento superparamagnético pode ser descrito pela equação de Langevin:

$$\frac{M}{M_s} = \coth \alpha - \frac{1}{\alpha} \quad \text{Eq. 3.2}$$

Onde M é a magnetização, M_s é a magnetização de saturação e α é o rácio entre a energia magnética e a energia térmica, definido por:

$$\alpha = \frac{\mu_0 m H}{k_B T} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Onde H é o campo magnético aplicado, m é o momento magnético, μ_0 é a permeabilidade do vácuo, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta [16][17].

3.2 Nanopartículas

O termo “nanopartículas” refere-se a materiais que apresentam um diâmetro entre 1 e 100 nanómetros, e geralmente contêm entre várias centenas até 10^5 átomos [12][18].

A medida que o tamanho das partículas diminui, a razão entre a área superficial e o volume das partículas aumenta. Por exemplo, para uma partícula com 1 μm de diâmetro, aproximadamente 0,15% dos seus átomos encontram-se à superfície, enquanto que para uma partícula com 6 nm de diâmetro, cerca de 20% dos seus átomos estão à superfície [19].

O tamanho à escala nanométrica, e a sua subsequente elevada razão superfície-volume, confere às nanopartículas propriedades físicas, químicas e mecânicas que as distingue dos materiais à escala macroscópica, sendo estas características o fator chave para novas aplicações [19]. As propriedades físicas incluem as propriedades óticas, elétricas e magnéticas. Um exemplo das propriedades químicas é a taxa de reativação química (processos catalíticos), e quanto as propriedades mecânicas estão incluídas a resistência e a dureza [12].

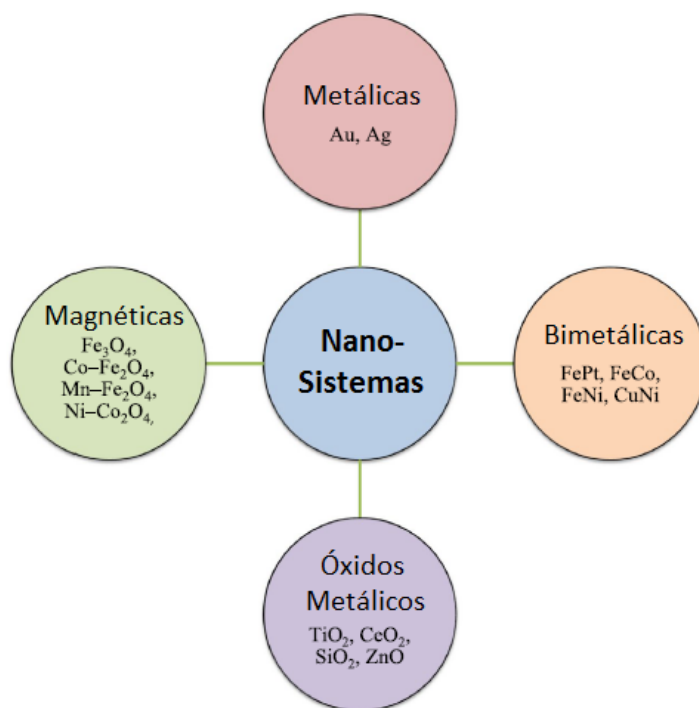


Figura 3.5-Esquemático para a classificação dos diferentes nanosistemas [4].

As nanopartículas, tal como apresentado na figura 3.5, podem ser divididas em 4 nanosistemas: metálicas, bimetálicas ou “ligas”, óxidos metálicos e magnéticas. No entanto, nanopartículas como a magnetite (Fe_3O_4) podem sobrepor mais do que uma dessas classes. A magnetite é simultaneamente um óxido metálico e uma nanopartícula magnética [4].

3.2.1 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas são caracterizadas por apresentarem uma resposta a um campo magnético [19]. São partículas com muito interesse científico, pois têm aplicações em várias áreas de investigação. No campo médico, podem ser utilizadas como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (IRM), agentes de libertação controlada de fármacos e em terapia tumoral, mais concretamente em tratamentos por hipertermia magnética [12][20].

3.2.1.1 Hipertermia magnética baseada em MNPs

A hipertermia é uma modalidade de tratamento na qual, o calor ou temperaturas corporais elevadas são utilizados como agentes terapêuticos. Nos últimos anos, tem havido um maior interesse no uso de hipertermia como terapia para o cancro, geralmente em conjunto com outras terapias que envolvem radiação (ver figura 3.6) [10].

Resumidamente, o objetivo dos tratamentos hipotérmicos é aumentar a temperatura do tecido cancerígeno acima de um valor terapêutico, tipicamente $42,5^{\circ}\text{C}$, mantendo os tecidos normais que circundam o tumor, abaixo de valores de temperatura que possam provocar dor, ou sejam mesmo prejudiciais ao seu funcionamento. Isto é possível graças à maior sensibilidade à temperatura das células cancerígenas do que as células normais [4][10][19].

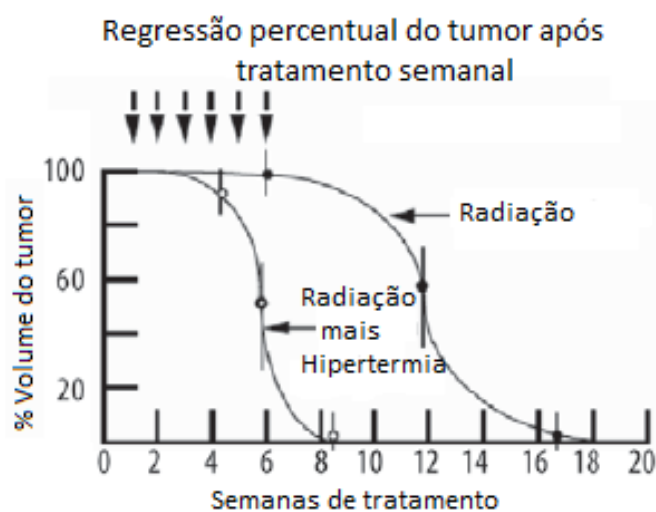


Figura 3.6 Influência da hipertermia na regressão de um tumor [21].

Recentemente, MNPs como a magnetite, têm atraído grande interesse para hipertermia magnética, devido a sua não toxicidade, biocompatibilidade e pelo facto de poderem provocar um aumento de temperatura na presença de campos magnéticos alternados [22].

A hipertermia de fluidos magnéticos baseia-se no princípio da conversão de energia eletromagnética em calor. As nanopartículas magnéticas são distribuídas em torno do local alvo e um campo magnético alternado é aplicado. Este campo magnético alternado fornece energia que ajuda os momentos magnéticos presentes nas partículas a sair do seu estado de equilíbrio. A energia é posteriormente dissipada quando os momentos das partículas relaxam de volta ao estado de equilíbrio [4]. Isso resulta no aquecimento das partículas, quer pela rotação browniana, quer pelo relaxamento de Neél. A rotação browniana é um mecanismo de relaxação que envolve a própria rotação da partícula contra as forças provenientes da viscosidade da solução [1][8][12][22].

O relaxamento Browniano é definido por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad \text{Eq. 3.4}$$

Onde τ_B é o tempo de relaxação Browniano, η é a viscosidade, V_H é o volume hidrodinâmico da partícula, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

A relaxação de Neél é resultado da rotação do momento magnético da partícula para o estado de equilíbrio, sem implicar a rotação da própria partícula. A relaxação de Neél é definida por:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_M}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. 3.5}$$

Onde τ_N é o tempo da relaxação de Neél, τ_0 é aproximadamente $10^{-12} - 10^{-9}$ segundos, K é a constante de anisotropia e V_M é o volume da partícula. Se os dois processos ocorrerem ao mesmo tempo:

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad \text{Eq. 3.6}$$

Sendo τ o tempo de relaxação quando as duas relaxações ocorrem simultaneamente. Os tempos de relaxação para cada mecanismo são dependentes do tamanho da partícula, quanto maior for a partícula, maiores serão as constantes de relaxação [4][12].

Em geral, a taxa de adsorção específica – SAR (do inglês, *specific adsorption rate*) é o parâmetro principal para determinar a eficiência com que as NPs produzem calor no tecido durante o tratamento com hipertermia magnética. A SAR é a taxa com que a energia eletromagnética (E_{em}) é absorvida por uma massa unitária de um material biológico (m) quando exposto a um campo eletromagnético de radiofrequência (R_F). Pode ser expressa da seguinte forma [23]:

$$SAR = \frac{d}{dt} \left(\frac{E_{em}}{dm} \right) \quad \text{Eq. 3.7}$$

A taxa de adsorção específica pode ainda ser definida como:

$$SAR = C \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad \text{Eq. 3.8}$$

Onde C é a capacidade térmica específica da amostra e $\Delta T/\Delta t$ é a taxa de aumento de temperatura [4][23].

3.3 Magnetite

3.3.1 Estrutura e propriedades

A magnetite é um mineral ferrimagnético cuja fórmula química é Fe_3O_4 . Pequenos grãos de magnetite podem ser encontrados em quase todas as rochas cristalinas, assim como algumas rochas sedimentares. Cristais de magnetite também têm sido encontrados em algumas bactérias, tais como *Magnetospirillum* e *Magnetotacticum*, em cérebros de abelhas, térmitas, algumas aves, como é o caso dos pombos, e até mesmo em seres humanos. Acredita-se que estes cristais estejam envolvidos na magnetorecepção, que é a capacidade para sentir a polaridade ou a inclinação do campo magnético da Terra, e estar envolvido na navegação - uma habilidade que pode ter sido perdida pelos humanos [19].

Entre as várias nanopartículas magnéticas, a magnetite é uma das mais importantes, pois apresenta propriedades superparamagnéticas à temperatura ambiente, para tamanhos inferiores a 15 nm [23]. É conhecida também a importância da magnetite em aplicações biomédicas, dada a sua não toxicidade, biocompatibilidade,

pequena dimensão, grande área superficial e propriedades magnéticas adequadas [4][7][8][18].

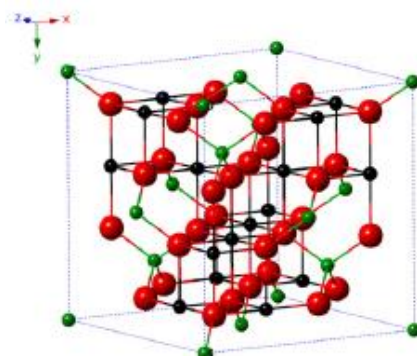


Figura 3.7-Estrutura da magnetite (as esferas a preto representam Fe II, a verde representam Fe III e as esferas a vermelho representam o oxigénio) [23].

Tal como se pode observar na figura 3.7, a magnetite tem estrutura de espinela cúbica de faces centradas, baseada em 32 iões O^{2-} e compactada na direção [111]. A magnetite difere da maioria dos outros óxidos de ferro por conter, quer ferro no estado bivalente (Fe^{2+}), quer ferro no estado trivalente (Fe^{3+}) [23].

Nesta estrutura, o empacotamento compacto dos aniões (neste caso oxigénio) origina dois tipos de interstícios distintos, tetraédrico e octaédrico, onde irão posicionar-se os catiões [24]. Os iões Fe^{2+} ocupam metade dos sítios octaédricos, e os iões Fe^{3+} estão divididos uniformemente entre os sítios octaédricos e tetraédricos [23].

3.3.2 Métodos de síntese

Até à data, têm sido aplicados vários métodos diferentes para a síntese de nanopartículas de óxidos de ferro (IONPs), tais como, co-precipitação, decomposição térmica, síntese hidrotermal e solvotermal, síntese sol-gel, microemulsão, irradiação de ultrassons e síntese biológica [23].

3.3.2.1 Precipitação química

Este é o método mais convencional para a síntese de IONPs, e utilizado neste trabalho, consiste na mistura de iões férricos e ferrosos, com um rácio molar de 1:2, em

soluções muito básicas à temperatura ambiente ou a temperatura elevada. O mecanismo de reação pode ser simplificado como:



Neste processo, uma fase de nucleação é seguida por uma fase de crescimento. A nucleação de Fe_3O_4 é mais fácil quando o pH da solução é inferior a 11, enquanto o crescimento do núcleo de Fe_3O_4 é facilitado por um pH da solução maior do que 11 [23].

No entanto, o controlo do tamanho e morfologia é limitado, uma vez que depende significativamente dos parâmetros experimentais, tais como, o tipo de sais utilizados (cloretos, percloratos, sulfatos, nitratos, etc.), do rácio entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , do pH, da força iónica do meio e da força da base usada [13][23]. Para sintetizar magnetite com sucesso, a oxidação do precursor de ferro (II) deve ser evitada, uma vez que leva à conversão da magnetite (Fe_3O_4) em magmiste (Fe_2O_3). Um método amplamente utilizado, para impedir eficazmente a oxidação, é borbulhar a solução com N_2 , o que conduz também a uma redução do tamanho das partículas [6][13].

3.3.3 Estabilização

Um problema associado aos IONPs, tendo em conta as suas dimensões físicas, é a sua instabilidade intrínseca ao longo do tempo. Esta instabilidade pode-se manifestar principalmente de duas formas distintas: em primeiro lugar, através da perda de dispersibilidade, onde as NPs têm tendência a agregar e a formar partículas maiores, de modo a reduzir a energia associada a tensão superficial; em segundo lugar, através da perda de magnetismo, pois as IONPs nuas são facilmente oxidadas, devido a sua elevada atividade química. Assim, é crucial desenvolver uma estratégia de proteção adequada, que permita estabilizar quimicamente as IONPs nuas [23]. Quando as NPs se aglomeram ou agregam, podem formar partículas maiores que sedimentam devido à gravidade. Este aumento de tamanho pode alterar as propriedades superparamagnéticas das NPs para propriedades ferromagnéticas [16]

A tendência das NPs se agregarem é explicada através do movimento Browniano. As NPs presentes numa solução coloidal colidem frequentemente, e a estabilidade global da dispersão depende do destino das NPs após cada colisão. Quando as forças de atração dominam (por exemplo, forças de *Van der Waals*), o movimento Browniano conduz a

uma agregação irreversível das NPs. No caso da magnetite, as interações magnéticas dipolo-dipolo, resultantes do momento magnético residual podem fornecer uma força atrativa adicional. As forças atrativas devem ser contrariadas com forças repulsivas, de modo a evitar a agregação das NPs. As forças repulsivas podem resultar da presença de uma dupla camada elétrica sobre as partículas (estabilização eletrostática), ou através da presença de cadeias poliméricas à superfície das NPs que proporcionam estabilização estereoquímica [9][19].

A estabilização das NPs pode ser feita através de tensioativos, tais como ácido oleico (AO), citrato de sódio e ácido dimercaptossuccínico (DMSA). No entanto, a sua incorporação em nanofibras é também um método de imobilização das NPs, prevenindo a sua agregação [8][9]. Assim, através desta incorporação, podemos de certo modo controlar o processo de crescimento das NPs, e em alguns casos controlar até mesmo o seu arranjo espacial [7].

3.4 Nanofibras

As nanofibras são caracterizadas por apresentarem diâmetros inferiores a 1000 nm. O seu comprimento pode variar entre dezenas de nanómetros até alguns micrómetros [6]. Quando os diâmetros das fibras poliméricas são reduzidos para algumas dezenas de nanómetros (10-100 nm), surgem algumas características que podem ser importantes para muitas aplicações. Essas características são uma elevada razão área superficial/volume, flexibilidade nas funcionalidades que a superfície pode apresentar e uma performance mecânica superior (maior rigidez e resistência a tração) em comparação com qualquer outra forma conhecida do material [25].

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para produzir nanofibras, tais como *drawing*, *templates synthesis*, *phase separation*, *self-assembly* e *electrospinning* (eletrofiação). De todas as técnicas, destaca-se a eletrofiação por ser o método mais acessível, versátil, de baixo custo e relativamente rápido [6][25][26].

3.4.1 Eletrofiação

Tal como se pode observar na figura 3.8, no processo de eletrofiação existem três componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma seringa com agulha metálica e um coletor onde são recolhidas as fibras [25].

Todo o processo implica a existência de uma solução precursora, constituída por um material polimérico e os respetivos solventes.

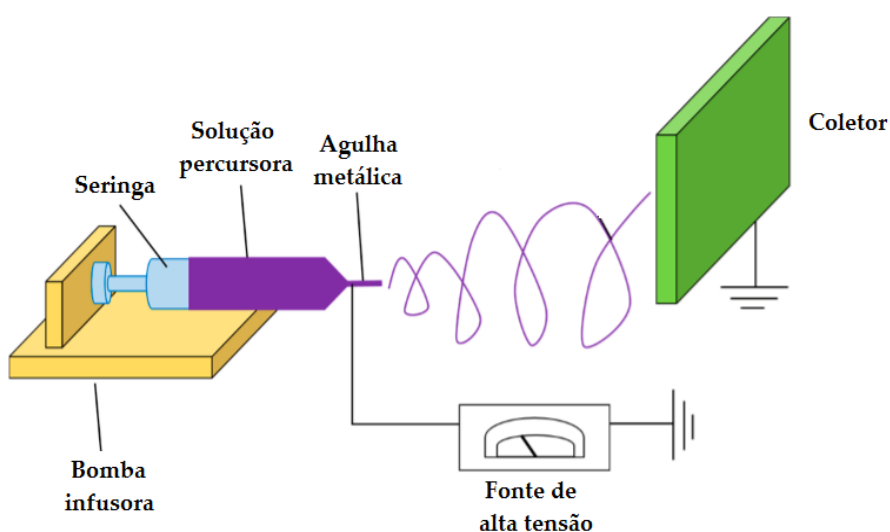


Figura 3.8- Representação esquemática do processo de eletrofiação [6].

Neste processo, a fonte de alta tensão é usada para criar um jato, eletricamente carregado, a partir da solução polimérica que sai da seringa com um caudal constante [27]. Antes de atingir o alvo, o solvente da solução evapora durante o voo, para que o jato possa ser recolhido como uma fibra. À medida que se acumulam fibras, forma-se uma rede interligada que constitui uma membrana. Um eléctrodo (positivo) é colocado na solução polimérica, mais concretamente na agulha metálica, e o outro é ligado ao coletor. Na maioria dos casos, o coletor é simplesmente ligado a terra, como indicado na figura 3.8.

Todo o processo se inicia através da ação do campo elétrico que é submetido à extremidade da agulha, onde se apresenta uma gota da solução precursora mantida pela sua tensão superficial. O processo induz uma carga à superfície da gota, esta acumulação de cargas à superfície dá origem a uma força de repulsão electrostática, esta força por sua vez é contrariada pela tensão superficial. À medida que a intensidade do campo

elétrico aumenta, a superfície hemisférica do fluido na ponta da agulha alonga-se, dando origem a uma estrutura cônica, mais conhecida como cone de Taylor (ver figura 3.9). Aumentando ainda mais o campo elétrico, é atingido um valor crítico para o qual a força de repulsão eletrostática supera a tensão superficial, e ocorre a formação de um jato carregado a partir da ponta do cone de Taylor. O jato sofre um processo de instabilidade e alongamento, o que faz com que o jato se torne muito longo e fino. Enquanto isso, o solvente evapora, deixando para trás uma fibra polimérica carregada, que é atraída para o alvo onde acaba por perder a sua carga [25].

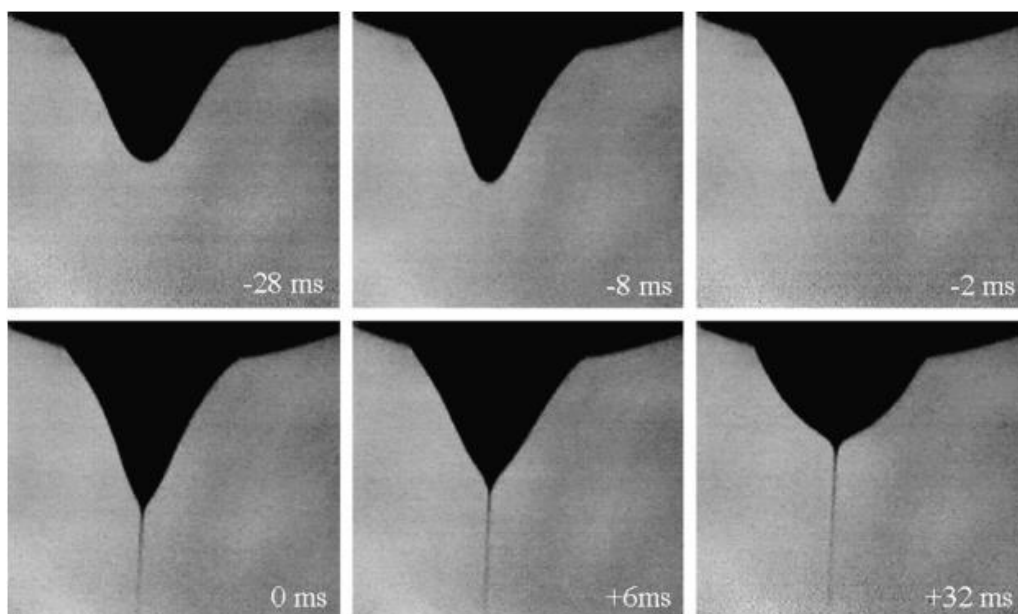


Figura 3.9- Evolução da forma da gota, no processo de formação do jato. O tempo 0 ms corresponde ao início do jato [28].

2.5.1.1. Parâmetros de controle

No processo de eletrofiação são muitos os parâmetros que podem afetar as propriedades das nanofibras. Esses parâmetros podem ser divididos em três categorias diferentes [25][29]:

- Parâmetros da solução;
- Parâmetros de processo- associados à geometria e funcionamento do sistema;
- Parâmetros ambientais- relacionado com as condições de processamento.

A tabela 3.1 resume os parâmetros que podem influenciar o processo de eletrofiação. Um parâmetro importante é a volatilidade do solvente, pois quando se usa um solvente com uma volatilidade muito baixa, as fibras são recolhidas muito húmidas. Por outro lado, se o solvente for demasiado volátil, o cone de Taylor vai solidificar, o que faz com que a produção pare.

Tabela 3.1-Variáveis do processo de eletrofiação [29].

Variáveis do processo de eletrofiação		
Parâmetros da solução	Parâmetros do processo	Parâmetros ambientais
Concentração	Potencial electrostático	Temperatura
Viscosidade	Força do campo eléctrico	Humidade
Tensão superficial	Forma do campo electrostático	Fluxo da atmosfera local
Condutividade	Distância de trabalho	Composição da atmosfera
Constante dielétrica	Taxa de alimentação	Pressão
Volatilidade do solvente (pressão de vapor)	Diâmetro da agulha	

Outro fator importante é a concentração de polímero na solução. O polímero é adicionado pela necessidade de um nível suficiente de interação intermolecular, que irá ajudar a minimizar as instabilidades do fluido e prevenir que o fluxo do jato quebre. A concentração relaciona-se diretamente com a viscosidade. Quanto maior a concentração, maior será a viscosidade. A solução deve apresentar uma viscosidade adequada para que o processo de eletrofiação ocorra, caso a viscosidade seja baixa pode ocorrer um processo de *electrospraying*. Em relação aos parâmetros de processo, a distância de trabalho e o potencial electrostático determinam a força do campo eléctrico. Normalmente, a força do campo eléctrico necessária para iniciar a formação do jato tem um valor entre 0.5 e 1.5 kV.cm⁻¹. Os parâmetros ambientais relacionam-se, essencialmente, com a taxa de evaporação do solvente, deve-se trabalhar em condições de temperatura e humidade que permitam uma taxa de evaporação do solvente adequada [25][29].

2.5.1.2. Compósitos poliméricos magnéticos

Os compósitos poliméricos magnéticos representam uma classe de materiais funcionais, onde nanopartículas magnéticas são incorporadas em matrizes poliméricas. O interesse neste tipo de materiais tem sido cada vez maior, uma vez que estes compósitos possuem potencial para diversas aplicações, dadas as suas propriedades elétricas, óticas e magnéticas [30].

No âmbito de obter nanofibras magnéticas, a adição de MNPs à solução precursora para eletrofiação pode ser benéfica, pois a distribuição espacial das MNPs pode ser confinada ao interior das nanofibras, sem empilhamento na direção radial. Contudo, pode ocorrer deformação do tamanho das nanofibras, devido à alteração da viscosidade que resulta dessa adição das MNPs à solução precursora, isto é, os parâmetros ideais para a eletrofiação serão alterados [6]. Alternativamente, pode-se utilizar um método relativamente simples de incorporação, através da adsorção das MNPs às nanofibras, quando as membranas são mergulhadas em soluções contendo as MNPs [31][32].

Estes compósitos podem ser uma mais-valia na aplicação de tratamentos por hipertermia magnética. A entrega das MNPs livres a um alvo específico com efeitos colaterais mínimos é um grande desafio [10]. As principais abordagens utilizadas para administrar as nanopartículas incluem a injeção direta, entrega passiva sistemática e a entrega ativa. Contudo, é um desafio administrar eficazmente estas nanopartículas ao local do tumor. Os fatores críticos incluem a filtração rápida no rim, a ação do sistema reticuloendotelial, a dependência do transporte eficiente da corrente sanguínea para as células alvo dentro dos tecidos, e por último, a dependência do efeito de permeabilidade e retenção aumentada no tumor (*EPR effect*) [33]. Além disso, a aplicação de MNPs livres tem outras limitações, tais como a baixa solubilidade e a fuga das mesmas a partir da região do tumor. Assim, novas estratégias que envolvem o uso de MNPs incorporadas em matrizes de nanofibras podem ser uma solução para o tratamento de tumores localizados [7]. Pode ser muito benéfico desenvolver uma matriz de nanofibras que transporte as MNPs, que possa ser administrável localmente com precisão, através de um método cirúrgico ou endoscópico na região do tumor para a hipertermia [33].

Dependendo do tamanho das nanopartículas e da força da sua fixação à matriz, diferentes mecanismos contribuem para o aquecimento que é induzido magneticamente,

nomeadamente, relaxamento de Néel, relaxamento Browniano e histerese. Desde que as MNPs sejam incorporadas e fixadas nas fibras, uma rotação completada das mesmas pode ser excluída (relaxamento extrínseco), e assim não existirá nenhuma contribuição do relaxamento Browniano para o aquecimento magnético. Assim, para partículas fixas, apenas as perdas de Néel e as perdas por histerese são responsáveis pelo aquecimento [4][5][9][23]. Caso as dimensões das partículas impliquem um comportamento superparamagnético, perdas por histerese também vão estar ausentes, sendo a relaxação de Néel a única responsável pelo aquecimento.



4 Materiais e métodos

Neste capítulo pretende-se fazer uma descrição dos procedimentos experimentais e parâmetros adotados durante a realização do trabalho experimental.

4.1 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas em foco neste estudo são compostas por óxidos de ferro, nomeadamente, a magnetite, por todas as suas propriedades físicas e químicas anteriormente descritas. Nos subcapítulos seguintes pretende-se descrever o seu método de síntese, e a sua posterior estabilização com ácido oleico e ácido dimercaptossuccínico.

4.1.1 Síntese

Neste trabalho recorreu-se a técnica de precipitação química para a síntese nas nanopartículas de magnetite, cujo procedimento se encontra descrito neste subcapítulo.

Materiais:

Cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 5 mmol (*Sigma-Aldrich*); Cloreto de ferro tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 2,5 mmol (*Sigma-Aldrich*); Solução de amónia (NH_4OH) a 25%: 10 ml (*Panreac*); Água ultrapura (*Milli-Q*)

Procedimento:

O procedimento utilizado resulta de uma adaptação do protocolo usado pela equipa de Gnanaprakash [34]. Num balão de três tubuladuras, mistura-se o cloreto de ferro hexahidratado e o cloreto de ferro tetra hidratado, previa e separadamente dissolvidos em 50 ml de água ultrapura. Faz-se borbulhar azoto na mistura, criando-se assim uma atmosfera rica em azoto. Seguidamente, sob agitação mecânica a 1000 rpm, adiciona-se 10 ml da solução de amónia, deixando em agitação durante 5 min. Ao fim desse tempo, adiciona-se água ultrapura de forma a parar a reação (60 ml) e procede-se a separação magnética. Após a deposição das NPs, repetir o processo de lavagem 2 vezes, caso se pretenda revestir posteriormente com ácido oleico. Caso se pretenda revestir as nanopartículas com DMSA, repetir a lavagem 4 ou 5 vezes.

4.1.2 Determinação da concentração de ferro

Para se determinar a concentração de ferro presente na solução de nanopartículas, recorreu-se ao método colorimétrico da 1,10-fenantrolina [35]. Saber a concentração de ferro é de extrema importância, pois está na base dos procedimentos de estabilização das NPs, a concentração de ferro presente na amostra vai impor a quantidade a adicionar de agente estabilizador.

Materiais

Ácido clorídrico 37% V/V (*Carlo Erba*); solução hidroclorídrica de hidroxilamina: 100 mg.ml⁻¹ (*Alfa Aesar*); fenantrolina: 3 mg.ml⁻¹ (*Applichem*); acetato de amónia 500 mM (*Sigma-Aldrich*).

Procedimento

Todas as soluções foram preparadas com ácido clorídrico (HCl 0,01 N), previamente diluído em água ultrapura. Após a preparação das soluções, pipetaram-se 40 µl da solução de NPs previamente sintetizadas e diluídas em água ultrapura, numa proporção de 1:100, juntamente com 20 µl de ácido clorídrico 37% V/V para um *epENDORF*. Deixou-se incubar durante 1 h para dissolver os óxidos de ferro e obter os cloretos férricos e ferrosos. Seguidamente, adicionou-se 100 µl da solução de hidroxilamina para

reduzir o Fe (III) a Fe(II), e 500 µl de fenantrolina para formar um complexo alaranjado de tris (1, 10-fenantrolina) Fe(II). Por fim, e de forma a perfazer um volume total de 1800 µl, no *ependorf*, juntou-se 1140 µl da solução de acetato de amónia.

Por último, procedeu-se à medição da absorvância da amostra a 510 nm, utilizando-se um espectrofotómetro UV-VIS (T90+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd). Com o intuito de minimizar erros inerentes a uma única leitura, todo este procedimento foi replicado em cinco *ependorffs* diferentes.

A concentração de ferro nas amostras foi calculada através de uma reta de calibração, cuja equação é:

$$\text{Abs} = 4,5079[\text{Fe}] + 0,0753 \quad \text{Eq. 4.1}$$

onde Abs representa a absorvância da amostra a 510 nm e [Fe] a concentração de ferro em mg.ml⁻¹. De forma a obter-se a concentração das nanopartículas, recorreu-se à fórmula $[\text{Fe}] = 0.7 \times [\text{NPs}]$ [16].

4.1.3 Estabilização

O principal objetivo da estabilização das nanopartículas é impedir que estas se agreguem e percam as suas propriedades superparamagnéticas e adquiram propriedades ferromagnéticas. Tais revestimentos criam forças repulsivas (principalmente repulsões estereoquímicas) de forma a compensar as forças magnéticas e de *Van der Waals* atrativas [36].

Para o revestimento das NPs efetuado neste trabalho, o procedimento foi baseado em estudos anteriormente realizados pela equipa de investigação do departamento de Ciências dos Materiais (FCT-UNL), de modo a obter uma estabilização mais eficiente [16].

4.1.3.1 Revestimento com ácido oleico

Após determinar a concentração de nanopartículas presente na suspensão coloidal, resultante da síntese por precipitação química, sonica-se a solução durante 5 minutos, posteriormente, adiciona-se o ácido oleico à solução. A quantidade que se deve adicionar corresponde a 64% da massa de nanopartículas presente na solução. Por último, coloca-se a mistura final a reagir, durante uma hora, em banho de ultrassons.

4.1.3.2 Revestimento com DMSA

De modo semelhante ao procedimento para o revestimento com ácido oleico, antes de se adicionar o DMSA, sonica-se a solução de NPs. No entanto, as nanopartículas devem estar num estado oxidado, sendo necessário ajustar o pH para 3.5 com a adição de ácido nítrico 65% (*Merck*).

A quantidade de DMSA a adicionar corresponde a um rácio de 4% em relação a quantidade de ferro presente na solução, isto é, o número de moles de DMSA deve ser 4% do número de moles de ferro na solução. Dilui-se o DMSA em água ultrapura, ajustando-se o pH para cerca de 5.5, com a adição de hidróxido de sódio 0.1 M. Após este ajuste, mistura-se a solução de DMSA com a solução de nanopartículas, e deixa-se a reagir durante uma hora em banho de ultrassons.

4.1.4 Caracterização

4.1.4.1 Difração de Raios-X

A técnica de difração por raios-X permite estudar a estrutura cristalina das nanopartículas, bem como o diâmetro da respetiva cristalite, quer as nanopartículas estejam revestidas ou não. No entanto, é necessária a liofilização das nanopartículas. Os padrões de difração foram adquiridos no difratómetro de raios-X *X'Pert PRO PANalytical*, com um passo em 2θ de 0.033, desde os 15° até aos 80° , utilizando radiação Cu-Ka ($k = 1.54060 \text{ \AA}$).

4.1.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR permite analisar as amostras de forma qualitativa, quanto à sua composição química. É possível identificar os picos de frequência de vibração associados às ligações dos seus constituintes químicos. Para a análise dos pós, previamente liofilizados, foi utilizado o espectrómetro *Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation* com o sistema *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectrometer* (ATR-FTIR).

Os espectros foram adquiridos com um ângulo de incidência de 45°, para um intervalo de 4000 – 480 cm⁻¹, e com uma resolução de 2 cm⁻¹.

4.1.4.3 Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

O DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering*) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de suspensões coloidais, nomeadamente para a medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão.

Assumindo que as partículas possuem um movimento Browniano aleatório, o diâmetro hidrodinâmico das partículas (D_h) pode ser calculado a partir da equação de Stokes-Einstein [16].

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta(T)D} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde k_B é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do fluido e D o coeficiente de difusão da luz.

Utilizou-se o equipamento *Horiba SZ-100 nanopartica series* e fez-se incidir um laser semiconductor com 532 nm. A medida de amplitude do ângulo de dispersão foi de 90° e foi utilizada uma célula descartável.

4.1.4.4 Análise da morfologia por TEM

A avaliação da morfologia e tamanho das nanopartículas de magnetite foi obtida através da microscopia eletrónica de transmissão (TEM, *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiônica, LaB6, e resolução ponto a ponto de 2.7 Å, do Instituto Superior Técnico). Para se observar as amostras no TEM, fez-se uma diluição das amostras a analisar, resultando numa concentração final de 0.5 µg.ml⁻¹. Uma pequena gota da suspensão foi colocada numa rede específica de carbono, até a evaporação total do solvente.

Esta técnica foi utilizada também para verificar a presença das NPs no interior das fibras, para os casos em que as NPs foram adicionadas a solução precursora de eletrofiliação.

4.1.4.5 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas para as NPs-DMSA foram avaliadas através da técnica de VSM (do inglês, *Vibrating Sample Magnetometer*). Para tal, usou-se um magnetómetro *10 T VSM (Cryogenic-Cryofree)*. Os parâmetros magnéticos de interesse, como a magnetização de saturação (M_s), coercividade (H_c) e magnetização remanescente (M_r), foram obtidos a partir das curvas de histerese magnética para a temperatura ambiente (300 K), com uma variação de campo aplicado de -2 T até 2 T.

Para as NPs nuas e NPs-AO, as propriedades magnéticas foram avaliadas utilizando um magnetómetro *7T SQUID (S700X; Cryogenic Ltd.)*. Sendo os parâmetros magnéticos de interesse calculados a 320 K, com uma variação do campo aplicado de - 5 T até 5 T. Para as NPs nuas também se obteve a curva de histerese a 5 K.

4.2 Eletrofiação

4.2.1 Equipamento

A fonte de alta tensão utilizada para o processo de eletrofiação foi uma *Glassman EL 30kV*, a qual foi conectada à agulha metálica através do polo positivo, e a terra foi ligada ao coletor. A bomba infusora, que permitiu manter um caudal constante da solução percursora, foi uma *KDS100* da *KD Scientific*. A solução foi sempre introduzida com cuidado numa seringa de 1 ml, com diâmetro interno de 4.50 mm, de modo a evitar bolhas de ar que interferissem com a produção. Quanto as agulhas metálicas utilizadas, foram produzidas pela ITEC, e utilizou-se sempre uma agulha de calibre 21 G neste trabalho.

Em relação à solução percursora, utilizou-se o polímero acetato de celulose, dissolvido num sistema binário de solventes composto por acetona e N, N- dimetilacetamida (2:1). No caso da eletrofiação coloidal, o sistema de solventes foi composto por: acetona; N, N- dimetilacetamida; solução de NPs (63:32:5).

As fibras foram coletadas numa folha de alumínio, estando o coletor fixo. Todo o equipamento estava envolvido numa caixa de acrílico, de modo a poder ser efetuado um

melhor controlo sobre os parâmetros ambientais do processo, sendo a humidade natural do laboratório cerca de 40-45%.

4.3 Adsorção das NPs

Após se obterem as NPs estabilizadas e as membranas de AC, foram recortados pedaços de membrana, com dimensões 2.5×1.5 cm, e colocados em adsorção em soluções com diferentes concentrações de NPs-AO e NPs-DMSA, durante 24 horas no agitador orbital com uma velocidade moderada. Após as 24 horas, lavou-se as membranas com água ultrapura para remover o excesso de NPs, e deixou-se secar lentamente à temperatura ambiente.

Para efeitos comparativos, optou-se por estudar apenas a adsorção das NPs às fibras de AC em soluções com concentrações 0.5 e 2.0 mg.ml⁻¹ de NPs, quer revestidas com DMSA, quer revestidas com ácido oleico.

4.4 Caracterização das membranas

4.4.1 Microscopia eletrónica de varrimento - SEM

A análise da morfologia e diâmetro das fibras foi efetuada através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM), com o equipamento *Carl Zeiss Auriga SEM* localizado no CENIMAT (Centro de Investigação de Materiais – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa). As amostras, cuja deposição foi de 15 minutos, foram colocadas numa placa metálica circular apropriada, através de fita de carbono de dupla face. Essa placa foi revestida com uma fina camada de ouro, e foi colocada na câmara de observação do equipamento, sob vácuo, procedendo-se a observação das amostras.

4.4.2 Espectroscopia de energia dispersiva – EDS

Esta técnica está acoplada ao SEM e permite produzir perfis dos elementos químicos presentes na amostra. Revelou-se importante para fazer um mapeamento e

detetar a presença de ferro nas fibras. Utilizou-se um equipamento da *Oxford Instruments EDS*.

4.4.3 Ensaio de tração

Os ensaios de tração são utilizados para determinar as propriedades mecânicas das membranas. As propriedades mecânicas descrevem as respostas características dos materiais quando lhes são aplicadas cargas ou deslocamentos externos. Um ensaio de tração consiste na aplicação uniaxial de uma carga de tração sobre um corpo de prova, provocando o seu alongamento e estiramento até à rutura. O registo das deformações que o material vai sofrendo ao longo do teste de tração e das cargas que induziram essas mesmas deformações, dá origem a um gráfico tensão vs deformação, através do qual é possível retirar parâmetros como o módulo de Young (E), tensão limite de elasticidade (σ_{LE}) e tensão de rutura (σ_{ROT}).

As amostras para os ensaios de tração foram recortadas de modo a apresentarem uma estrutura retangular com dimensões de 20 x 10 mm. A espessura das amostras foi determinada com uma craveira digital (*Mitutoyo*, 0 - 25 mm), com uma precisão de 0.001 mm. Os ensaios de tração foram realizados numa máquina de ensaios de tração uniaxial, *Rheometric Scientific*, com célula de carga de 20 N e operável através do software “Minimat” (*Minimat Control Software Version 1.60 February 1994 (c) P.L. Thermal Science 1984-94 Reometric Scientific Ltd.*). Aplicou-se uma velocidade de 1 mm.min⁻¹, em condições de temperatura e humidade ambiente. Apenas 5 mm do comprimento da amostra foram tracionados, destinando-se os 15 mm restantes à fixação da mesma. Para cada tipo de membrana foram testadas 10 amostras.

4.5 Ensaio de citotoxicidade

4.5.1 Citotoxicidade

Uma vez que este estudo visa o contacto direto das membranas de acetato de celulose (AC) com os tecidos, torna-se necessário determinar a sua biocompatibilidade. Para tal, de forma a avaliar a citotoxicidade das membranas, realizaram-se ensaios de

acordo com a norma ISO 10993 *Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* usando o método do extrato e células Vero (células epiteliais de rim de macaco).

4.5.2 Procedimento

Os ensaios através do método do extrato consistem em colocar as células em contacto com o meio onde previamente estiveram incubadas as membranas. Para verificar o número de células viáveis, foi utilizado um método colorimétrico baseado no reagente resazurina, que é reduzido pelas células vivas.

Para produção do extrato, diferentes amostras foram recortadas de modo a possuir uma massa idêntica de 5 mg. As amostras foram previamente esterilizadas com irradiação UV durante 1 hora. Posteriormente, colocou-se cada membrana em 1 mL de meio, à temperatura de 37 °C, durante 48 horas. As células foram semeadas em duas placas de 96 poços, sendo utilizados 20 poços para cada tipo de membrana (5 réplicas para a concentração inicial de meio de extrato - 5 mg.mL⁻¹ - mais 5 réplicas para cada uma de 3 diluições de fator 2 a partir da concentração inicial), num total de 7 membranas diferentes. Além disso, foram feitos controlos positivos, negativos e de meio celular (figura 4.1), servindo como referência para o cálculo da viabilidade celular.

Em cada poço foram semeadas aproximadamente 6 000 células (20 000 por cm²) em 100 µL de meio de cultura completo (meio DMEM suplementado com soro fetal bovino).

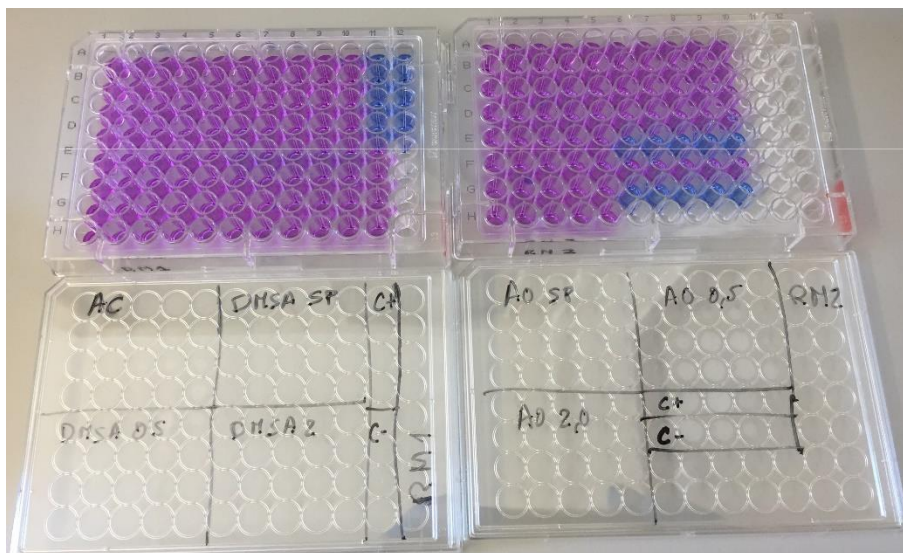


Figura 4.1-Distribuição da sementeira de células nas duas placas de 96 poços, utilizadas para efetuar os ensaios de citotoxicidade.

A resazurina (cor azul) é reduzida a resorufina, composto rosa e fluorescente, pelas células metabolicamente ativas. Assim, dentro de certos limites (densidade celular e tempo de incubação), a conversão de resazurina em resorufina é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A resorufina possui o máximo de absorvância a um comprimento de onda de cerca de 570 nm, enquanto a resazurina possui um máximo a 600 nm, pelo que é possível avaliar a atividade celular através das medições de fluorescência a 570 e 600 nm. As medidas foram efetuadas através do leitor de microplacas *Biotek ELX 800 UV*.

4.6 Ensaios de hipertermia magnética

As medidas de hipertermia magnética foram obtidas utilizando o equipamento *NanoScale Biomagnetics, DM100 Series*. Este equipamento permite medições em diferentes intensidades de campo magnético até 24 kA.m^{-1} com uma frequência fixa de 418.5 kHz. Neste trabalho, foi testada a capacidade de aquecimento de 10 mg de vários tipos de membranas com MNPs incorporadas. Durante os ensaios as membranas estavam mergulhadas em 1 ml de água ultrapura.

Para avaliar o comportamento térmico das membranas, as medidas foram realizadas durante 10 minutos, mantendo a densidade de fluxo magnético a 300 Gauss e a frequência nos 418.5 kHz.

5 Análise e discussão de resultados

5.1 Nanopartículas magnéticas

5.1.1 Caracterização estrutural e morfológica

5.1.1.1 Difração de Raios-X

A análise da difração de Raios X permite avaliar a estrutura cristalina das nanopartículas. A figura 5.1 representa o padrão de DRX para as nanopartículas sintetizadas por precipitação química, sem qualquer revestimento. Este padrão apresenta seis picos característicos, situados em 2θ igual a 30.1; 35.5; 43.2; 53.5; 57.0 e 62.8, os quais correspondem aos planos de difração (220), (311), (400), (422), (511) e (440), respetivamente. Comparando com as fichas padrão (código de referência: JCPDS 00-019-0629 para a magnetite e JCPDS 00-039-1346 para a magmíte), podemos afirmar que as partículas possuem uma estrutura cúbica cristalina, pois os picos são coincidentes.

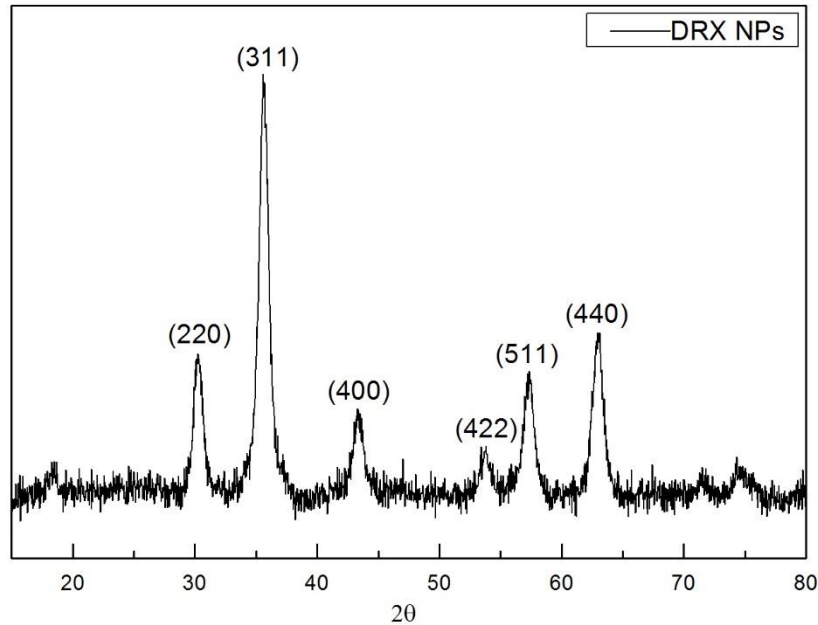


Figura 5.1-Padrão de difração de Raios-X das nanopartículas sintetizadas por precipitação química, sem qualquer agente estabilizador.

Uma vez que a magnetite e magmíte apresentam os seus picos característicos para valores semelhantes de 2θ , é a diferença de intensidade entre o pico (440) e os picos (220) e (511) que permite concluir que estamos maioritariamente na presença de magnetite. Além disso, os picos (511) e (220) apresentam intensidades praticamente semelhantes, o que também é característico da magnetite. No entanto, uma pequena fração de magmíte também deve estar presente.

O tamanho médio da cristalite, τ , obtido para o pico mais intenso, correspondente ao plano (311), é calculado usando a fórmula de Scherrer:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Eq. 5.1}$$

Onde K representa uma constante que depende da forma das partículas (0,94), λ o comprimento de onda da radiação incidente, β a largura a meia altura do pico mais intenso, e θ representa o respetivo ângulo em radianos. O valor obtido a partir da equação é de aproximadamente 9.75 nm.

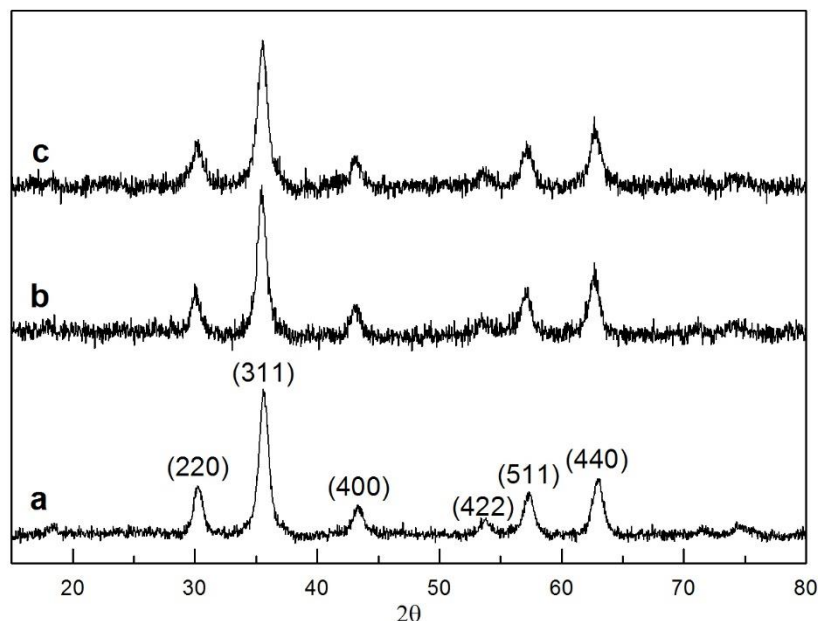


Figura 5.2- Difratoograma de raios-X de (a) NPs sintetizadas por precipitação química, sem qualquer revestimento (b) NPs revestidas com ácido oleico 64 mM (c) NPs revestidas com ácido dimercaptosuccínico- DMSA com um rácio de 4% em relação ao número de moles de ferro em solução.

As IONPs estabilizadas quer com AO, quer com DMSA mantêm a estrutura cristalina de Fe_3O_4 , tal como é representado na figura 5.2. Pode-se notar que os padrões de difração não se alteram, mostrando assim que a estabilização não afeta a estrutura cristalina da magnetite. Em relação ao tamanho médio da cristalite, esse valor foi calculado para as NPs revestidas, e verificou-se que não sofre alteração em função do revestimento, mantendo-se aproximadamente em 9.75 nm.

5.1.1.2 FTIR

A figura 5.3 representa o espectro FTIR para as NPs de magnetite sintetizadas por precipitação química. No espectro observam-se bandas a aproximadamente 560 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} . A banda a cerca de 560 cm^{-1} corresponde à vibração da ligação Fe – O, o que confirma a presença de um óxido de ferro. A banda de absorção em torno de 3400 cm^{-1} é característica da vibração da deformação axial do grupo funcional hidroxilo (H-O-H) à superfície das nanopartículas ou de água adsorvida na amostra. A vibração da deformação angular do grupo (H-O-H) também pode ser localizada na banda a 1630 cm^{-1} [37].

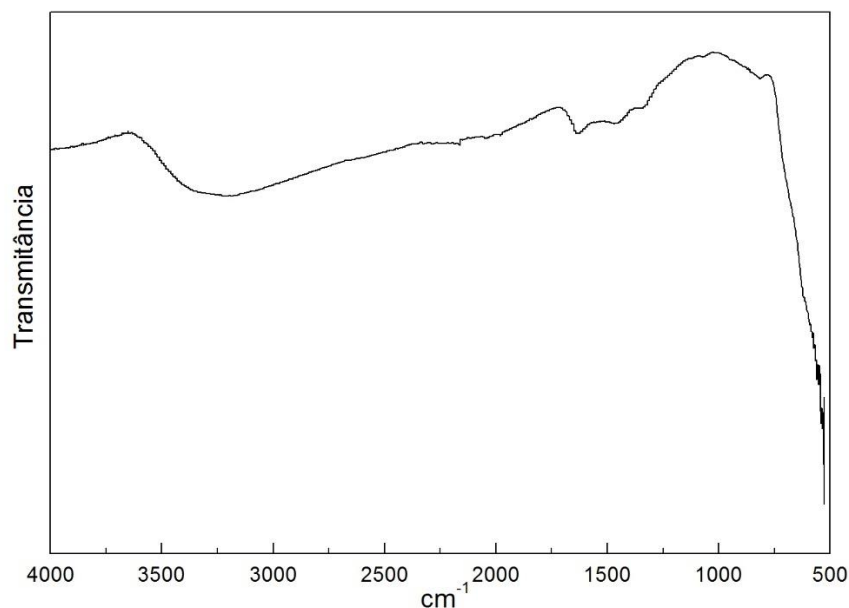


Figura 5.3-Espectro de FTIR para as NPs sintetizadas por precipitação química sem qualquer revestimento.

A partir da figura 5.5 podemos observar também o espectro de FTIR para as NPs revestidas quer com AO, quer com DMSA. Em todos os espectros podemos notar a presença de uma banda a 560 cm^{-1} , tal como referido anteriormente, representando a presença da ligação Fe-O. Em relação ao espectro para NPs revestidas com ácido oleico, cuja ligação está representada na figura 5.4, foram detetadas bandas para 2849 cm^{-1} e 2921 cm^{-1} que representam a elongação simétrica e assimétrica da ligação CH_2 , respetivamente. As bandas a 1521 cm^{-1} e 1434 cm^{-1} são representativas da elongação simétrica e assimétrica da ligação $-\text{COO}-$, respetivamente. A banda a 1710 cm^{-1} é característica da vibração da dupla ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo carboxilo. Por último, a banda a 1407 cm^{-1} é característica da ligação CH_3 , presente na molécula de ácido oleico [38].

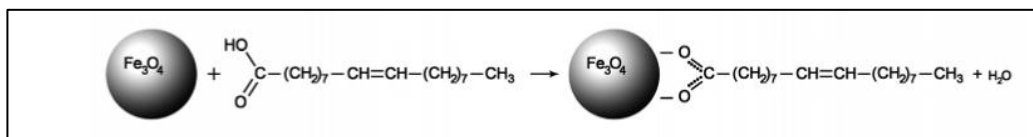


Figura 5.4- Esquema representativo da ligação entre Fe_3O_4 e o ácido oleico.

Em relação ao espectro de FTIR para as NPs revestidas com DMSA, pode-se notar essencialmente a presença de duas bandas mais intensas a 1575 cm^{-1} e 1355 cm^{-1} associadas a elongação simétrica e assimétrica do carboxilato, respetivamente. A presença dessas bandas sugere que as moléculas DMSA foram ligadas a superfície do

Fe através de grupos -COO- . Existem também duas bandas presentes a 1074 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} associadas a ligação C-O. No entanto, a banda que representa a ligação S-H, para aproximadamente 2960 cm^{-1} , está praticamente inexistente [39]–[41].

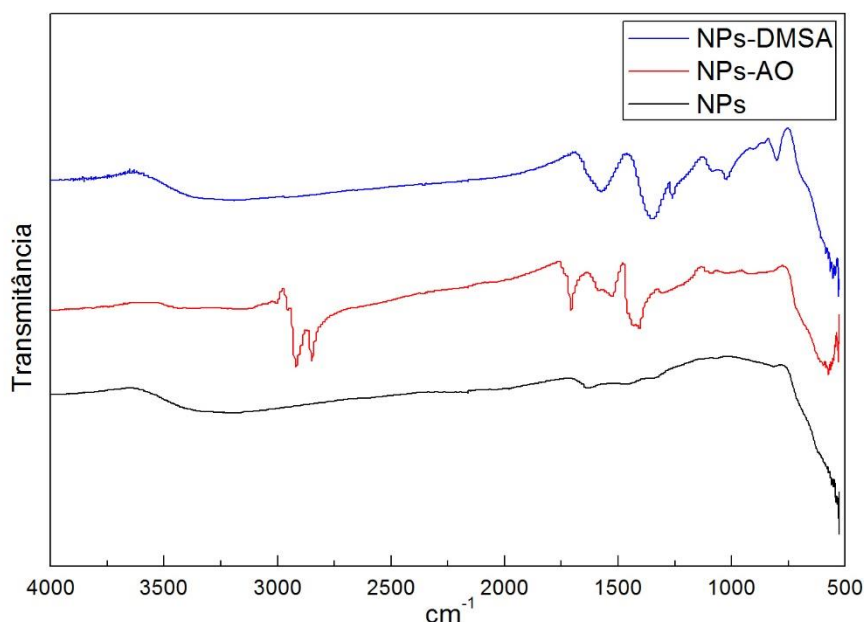


Figura 5.5- Espectros de FTIR para (preto) magnetite sem qualquer revestimento (vermelho) magnetite revestida com AO (azul) magnetite revestida com DMSA.

Em ambos os espectros de FTIR para as nanopartículas revestidas, ficou evidente a ligação entre o tensioativo utilizado e a magnetite. Nos dois espectros podemos verificar a existência de duas bandas que resultam de um deslocamento da banda do grupo carboxilo (1700 cm^{-1}) para frequências menores devido a sua dissociação para ser o ligando entre o tensioativo e a magnetite.

5.1.1.3 Microscopia eletrónica de transmissão

Na figura 5.6, figura 5.7 e figura 5.8, apresentam-se as imagens TEM e os gráficos de distribuição de tamanhos para as NPs de magnetite sem qualquer estabilização, revestidas com AO e DMSA, respetivamente. Para se obter a distribuição de tamanhos, foram calculados os diâmetros de 50 nanopartículas através do programa *imagej*.

Podemos destacar o facto dos valores de diâmetro médio das NPs, obtidos pela análise das imagens TEM (9.4 nm para as NPs nuas, 9.8 nm para NPs-AO e 10.2 nm para NPs-DMSA), serem muito semelhantes aos valores de tamanho médio da cristalite,

determinados a partir dos difratogramas de raios-X (9.75 nm). Os resultados mostram também que, de um modo geral, o tensioativo utilizado não alterou a morfologia das partículas, que apresentam uma forma quase esférica e tamanhos muito semelhantes. No entanto, apesar de exibirem boa dispersão, as partículas apresentam ainda alguma aglomeração devido à sua elevada área de superfície, e às interações magnéticas dipolo-dipolo entre partículas.

A magnetite é uma das nanopartículas mais importantes para aplicações biomédicas devido as suas propriedades físicas e químicas. No entanto, apenas apresenta propriedades superparamagnéticas para tamanhos inferiores a 15 nm, à temperatura ambiente [23]. Pode-se concluir que as NPs sintetizadas se apresentam nas condições ideais para aplicações biomédicas, uma vez que o seu tamanho médio é de aproximadamente 10 nm. Estas NPs comportam-se como átomos gigantes paramagnéticos com resposta rápida aos campos magnéticos aplicados, realçando ainda mais a sua importância em aplicações biomédicas.

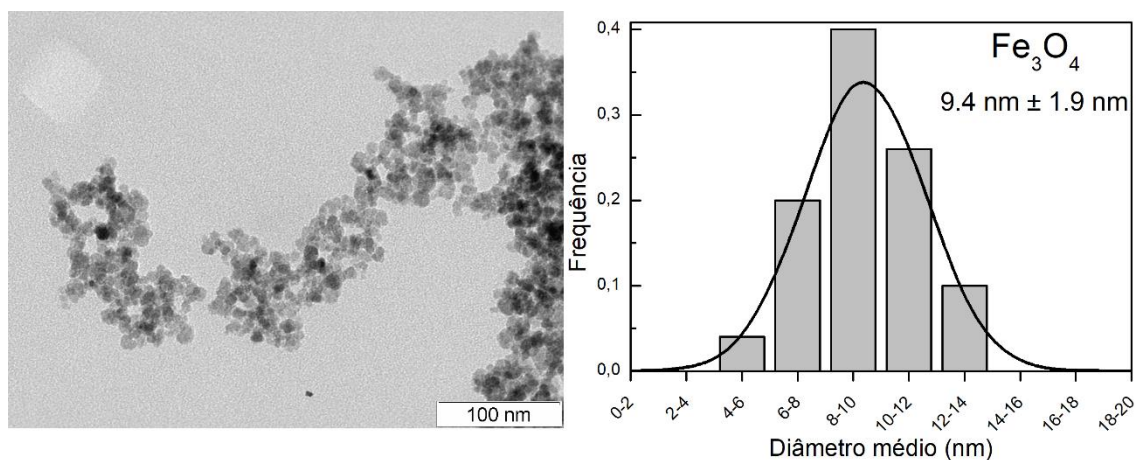


Figura 5.6- Imagem TEM da magnetite sem revestimento e respetiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.

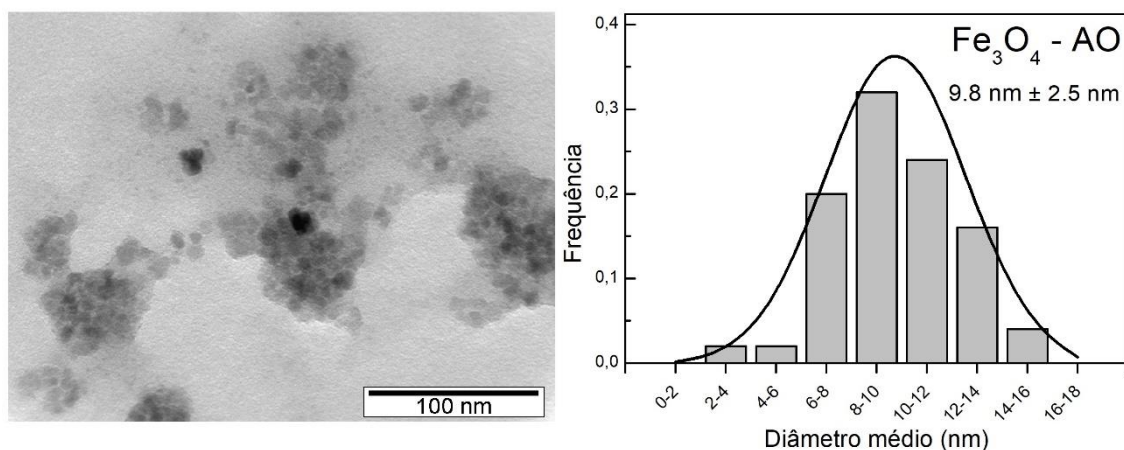


Figura 5.7-Imagem TEM da magnetite revestida com ácido oleico e respectiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.

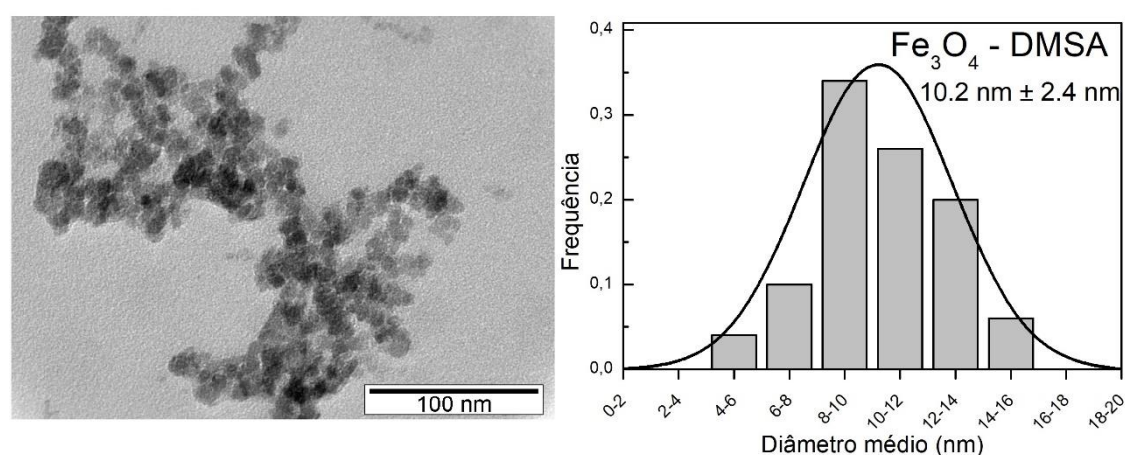


Figura 5.8- Imagem TEM da magnetite revestida com DMSA e respectiva distribuição de tamanhos das nanopartículas.

5.1.1.4 Diâmetro hidrodinâmico das MNPs

A figura 5.9 representa a curva experimental medida através da técnica de dispersão dinâmica da luz, quer a para as nanopartículas revestidas com AO, quer para as nanopartículas revestidas com DMSA, e as respectivas curvas de autocorrelação ajustadas. Tal como se pode observar, tanto para o revestimento com DMSA como para o revestimento com AO, a um pH neutro e com uma concentração de NPs de 0.05 mg.ml⁻¹, apenas um modo de relaxação está presente. Assim, pode ser indicador da ausência de agregados de grandes dimensões ou poeiras que estejam a contaminar a amostra, geralmente estão associados a um segundo modo de relaxação mais lento.

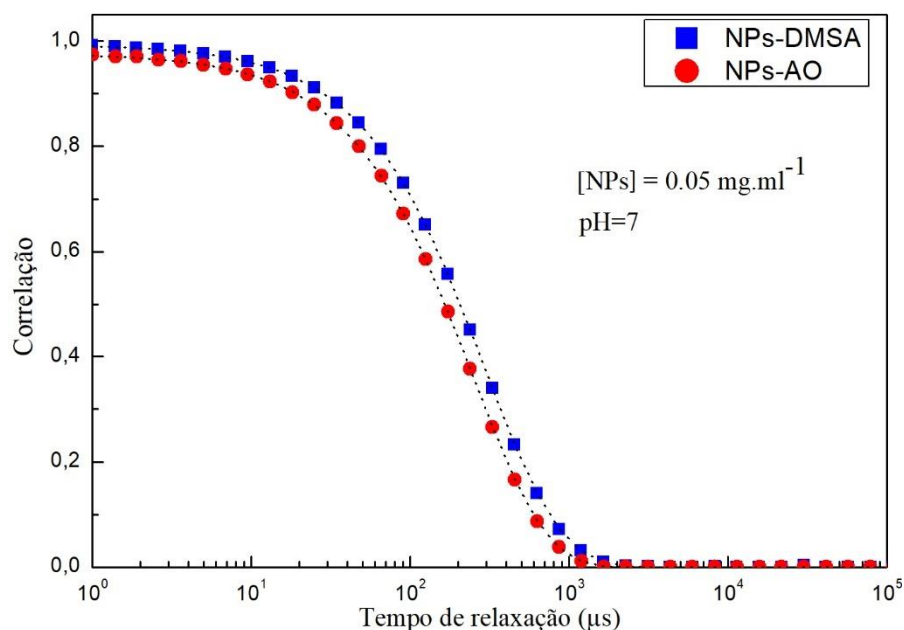


Figura 5.9- Curvas experimentais (pontos) obtidas através da técnica de dispersão dinâmica da luz para nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com DMSA (azul) e ácido oleico (vermelho) e respectivas curvas de autocorrelação ajustadas (tracejado).

Para analisar os dados obtidos a partir das medidas experimentais, o método de expansão em cumulantes foi utilizado para cada medida. Este método é baseado na expansão em série de Taylor da expressão que relaciona a curva de autocorrelação com a curva experimental. Por sua vez, esta expressão relaciona-se com a equação de Stokes - Einstein (Eq. 4.2), a qual permite calcular os diâmetros hidrodinâmicos [16].

Para o cálculo dos diâmetros hidrodinâmicos foram preparadas soluções com diferentes concentrações de NPs, essas concentrações foram [0.01], [0.05], [0.10], [0.15], [0.20] e [0.25] mg.ml^{-1} . Para cada concentração foram realizadas 5 medidas, sendo as respectivas curvas experimentais semelhantes as representadas na figura 5.9.

A figura 5.10 apresenta os valores dos diâmetros hidrodinâmicos calculados para as diferentes concentrações de NPs revestidas com ácido oleico. Podemos notar a existência de 2 grupos de diâmetros distintos com cerca de 140 nm e 79 nm. Em relação às NPs revestidas com DMSA os resultados encontram-se descritos na figura 5.11, notando-se também a existência de dois grupos de diâmetros distintos, respectivamente com cerca de 164 nm e 101 nm.

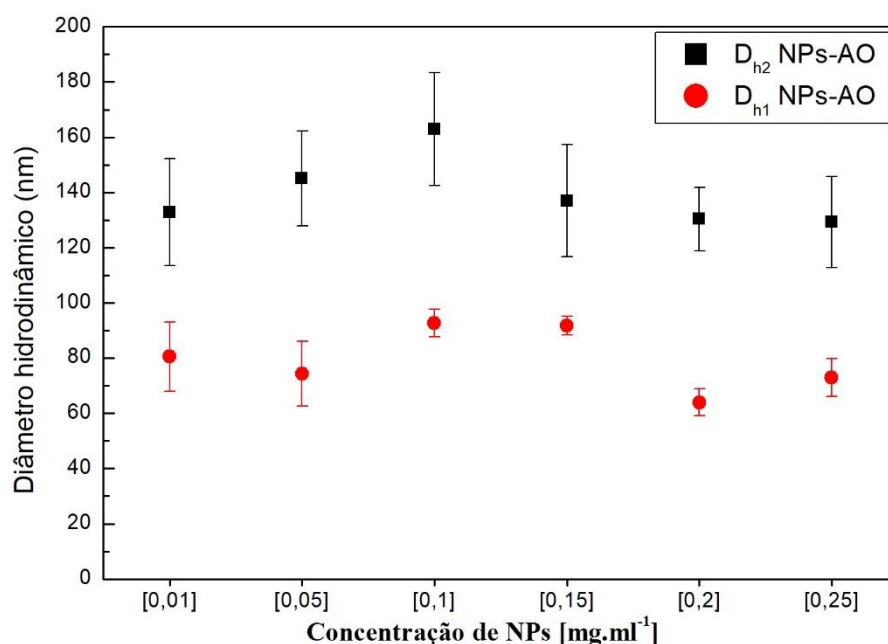


Figura 5.10- Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) calculados para soluções de NPs revestidas com ácido oleico a diferentes concentrações.

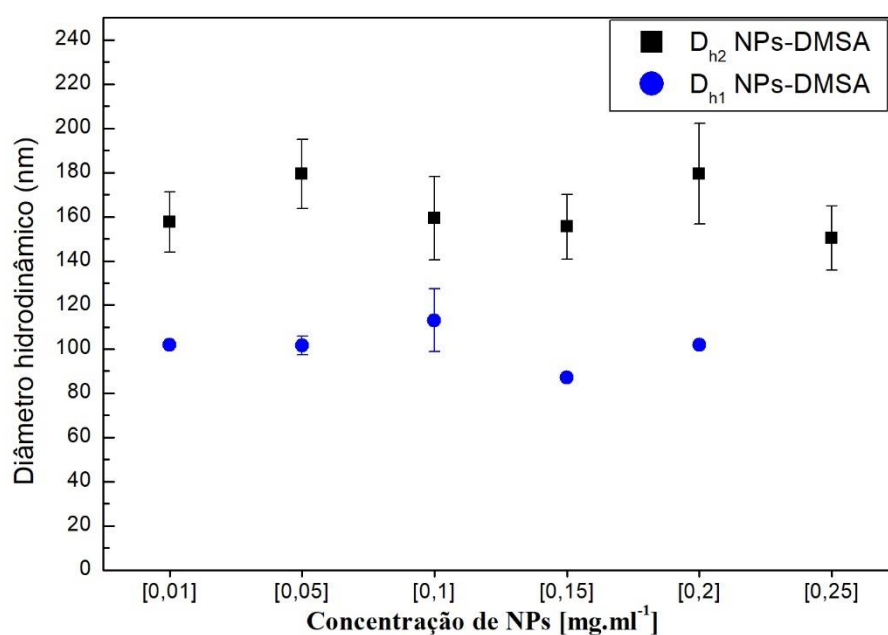


Figura 5.11- Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) calculados para soluções de NPs revestidas com DMSA a diferentes concentrações.

Comparando os diâmetros hidrodinâmicos calculados por DLS e o tamanho médio das nanopartículas obtidos por TEM, os quais não contabilizam a espessura do revestimento, é notória a discordância entre os resultados adquiridos por ambas as técnicas. Mesmo considerando que a espessura da camada de ácido oleico é de cerca de 2 nm, e existe a presença de uma bicamada ligada às nanopartículas, existe uma

discrepância de uma ordem de magnitude entre os resultados. Esta diferença pode ser justificada pelo facto das NPs resultantes da síntese por precipitação química não serem estáveis, o que faz com que estas se agreguem ainda antes da adição do tensioativo. Desta forma, o ácido oleico irá formar uma bicamada à volta de agregados de nanopartículas de Fe_3O_4 e não de partículas individualizadas, originando um diâmetro hidrodinâmico uma ordem de grandeza acima quando comparado com os resultados provenientes das imagens de TEM [36].

5.1.1.5 Propriedades magnéticas

A análise da resposta magnética das NPs de magnetite em função do campo magnético aplicado, mostrou uma magnetização de saturação (M_s) igual a 67 emu.g^{-1} para a temperatura de 10 K, e 58 emu.g^{-1} para a temperatura de 320 K, tal como representado na figura 5.12. Esses resultados são inferiores aos valores encontrados na literatura para a magnetite com dimensões macroscópicas (92 emu.g^{-1} , para a *bulk* magnetite). Esse resultado deve-se à interação desordenada dos momentos magnéticos dos átomos à superfície, e ao distúrbio causado pela inversão da estrutura de espinela, como resultado da pressão de Laplace. O efeito de superfície é mais evidente em partículas pequenas, devido ao aumento do rácio de átomos presentes à superfície [38], [42], [43].

A ampliação das curvas de magnetização em torno da região central mostrou que a 320 K, a magnetite apresentou uma magnetização remanescente e uma coercividade desprezáveis. O que indica que para 320 K a magnetite possui um comportamento superparamagnético, com ausência de histerese magnética. Estes dados são confirmados pela literatura, pois para dimensões de cerca de 10 nm para as NPs, e acima da temperatura de bloqueio (T_B), as NPs apresentam um comportamento superparamagnético. O valor de T_B pode variar em função do tamanho da partícula e do tipo de revestimento, mas normalmente essa variação é entre 150 e 230 K, garantindo que as NPs são superparamagnéticas a temperatura ambiente [16], [24], [39], [44], [45].

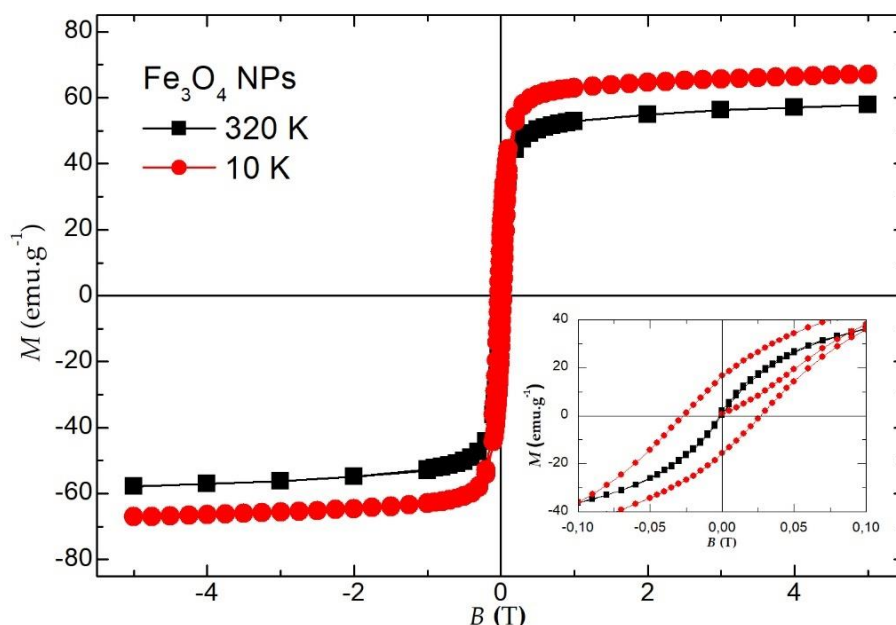


Figura 5.12-Magnetização em função do campo aplicado, para NPs de magnetite à temperatura de 10 K (vermelho) e a 320 K (preto).

A 10 K a magnetite mostrou um comportamento diferente, com uma abertura na curva de histerese, apresentando coercividade e magnetização remanescente de 270 Oe e 17 emu.g⁻¹, respetivamente. A 10 K as NPs estão abaixo da T_B , o que implica que estas não possuem energia suficiente para sobrepor a barreira energética anisotrópica, que é a energia necessária para reverter a magnetização de um estado estável para outro.

Na figura 5.13 estão representadas as curvas de magnetização para as NPs de magnetite sem qualquer revestimento, e estabilizadas com AO ou DMSA. Todas as curvas apresentam um comportamento semelhante, sendo descritas pela função de Langevin, não apresentando histerese, o que é característico de NPs superparamagnéticas. Pode-se verificar que o revestimento das NPs com DMSA, não afeta as suas propriedades magnéticas, dada a sobreposição das curvas, ambas apresentando uma magnetização de saturação de 58 emu.g⁻¹. No entanto, para as nanopartículas revestidas com AO, nota-se uma diminuição na M_s para um valor de 46 emu.g⁻¹. Essa diminuição pode ser devida ao facto de se utilizar uma concentração de 64 mM de AO para a estabilização, podendo ser uma concentração elevada ao ponto de reduzir os momentos magnéticos à superfície, devido a contribuição diamagnética do tensoativo utilizado [46]. Além disso, a formação de uma dupla camada de AO influencia o valor de M_s [16].

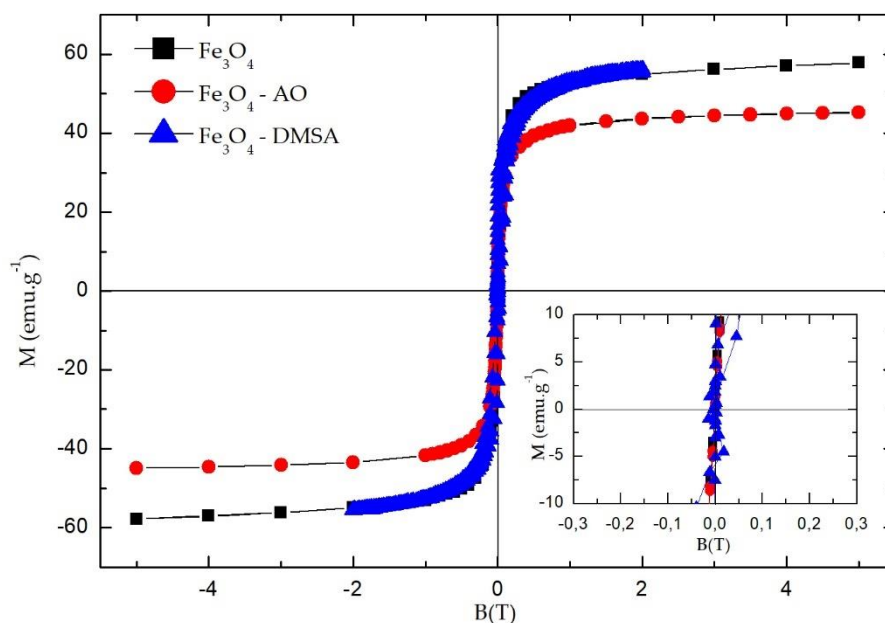


Figura 5.13-Curvas de magnetização a 320 K para NPs de magnetite (preto), NPs de magnetite revestidas com AO (vermelho) e revestidas com DMSA (azul).

Em suma, a estabilização das NPs não afeta as suas propriedades superparamagnéticas. No entanto, para as NPs estabilizadas com AO, ocorre uma diminuição da M_s , que é resultado de uma elevada concentração de tensioativo. Deve-se realçar que o comportamento superparamagnético das MNPs à temperatura ambiente é muito importante para aplicação *in vivo*, uma vez que as partículas não retêm nenhuma magnetização após a exposição ao campo magnético, reduzindo também a probabilidade de se agregarem devido a atração dos dipolos magnéticos [42].

5.2 Membranas produzidas por eletrofiação

5.2.1 Determinação dos parâmetros de produção

Inicialmente, foi realizado um estudo sobre o efeito dos vários parâmetros que influenciam o processo de eletrofiação (tensão aplicada, distância da agulha-coletor, caudal e humidade), de modo a determinar um conjunto de parâmetros adequados para a produção de fibras de boa qualidade a partir de uma solução de acetato de celulose, com os solventes acetona e N,N-dimetilacetamida (2:1). Neste estudo fixou-se a concentração da solução em 12% m/m.

Para estudar a influência que cada parâmetro tem na morfologia das fibras, utilizaram-se as condições padrão referidas na literatura (concentração 12% m/m, distância agulha-coletor 20 cm, caudal 0.1-1.5 ml/h, potencial aplicado 20 kV e humidade de 50%) [47][48]. A partir destes valores referência, fez-se variar apenas um dos parâmetros de cada vez, mantendo os outros constantes.

As amostras que apresentaram fibras fundidas ou com contas, foram excluídas da escolha dos parâmetros de eletrofiação. Numa fase inicial, todas as fibras obtidas para diferentes condições de eletrofiação foram observadas por microscopia ótica, aquelas que apresentaram boas características morfológicas, com ausência de defeitos e uma uniformidade no diâmetro das fibras, foram selecionadas para observação por SEM. A figura 5.14 representa um exemplo de duas imagens de microscopia ótica, com diferentes ampliações, de um conjunto de fibras que foi selecionado para observação por SEM.

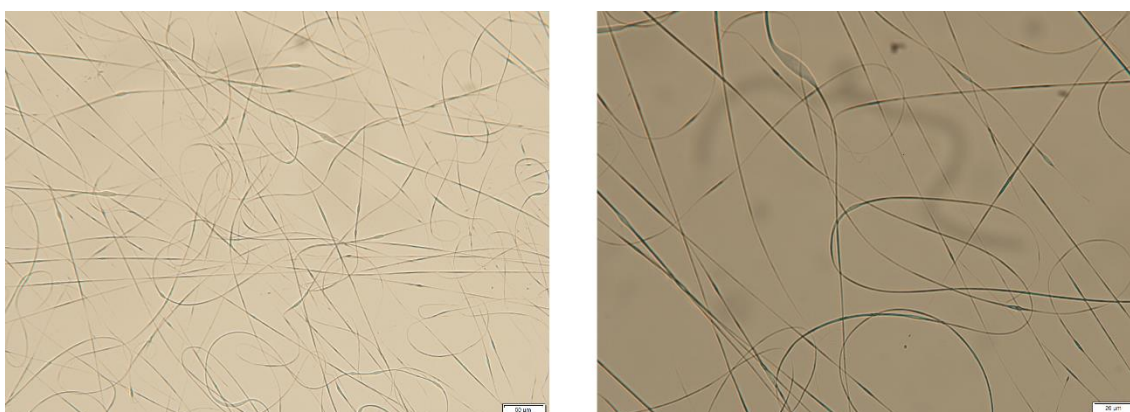


Figura 5.14-Fotografias resultantes da observação ao microscópio ótico de fibras resultantes do processo de eletrofiação, com ampliação de x20 (esquerda) e ampliação x50 (direita). Tensão aplicada de 20 kV; distância agulha-coletor de 11 cm; humidade a 41%; temperatura a 21 °C; caudal igual a 0.15 ml/h.

A tabela 5.1 reúne todas as amostras que foram selecionadas para SEM. A análise das imagens SEM, permite obter mais informação sobre quais as amostras que apresentam uma distribuição mais uniforme de diâmetros, calculados através do programa *imagej*, selecionando-se 25 fibras aleatoriamente.

Tabela 5.1-Amostras que foram selecionadas para observação por SEM.

Amostra	Temperatura (°C)	Humidade (%)	Caudal (ml/h)	Distância (cm)	Potencial (kV)
A1	22.7	46	0.2	15	20
A2	20.5	41	0.2	15	20
A3	22.5	32	0.2	15	20
A4	21.9	37	0.2	15	20
A5	20.9	43	0.2	15	20
A6	20.5	41	0.2	15	17
A7	20.8	41	0.2	11	20
A8	21.0	41	0.15	11	20
A9	21.8	40	0.15	15	20
A10	21.8	40	0.15	17	20
A11	21.8	46	0.2	17	20

Os resultados para os diâmetros médios das fibras, encontram-se presentes na tabela 5.2. As amostras A3 e A10 possuem os diâmetros médios mais baixos, o que implica que possuem uma área superficial mais elevada, o que é crucial para que a adsorção de NPs seja mais eficiente. O controlo da humidade no laboratório é difícil, pelo que se optou por produzir membranas segundo as condições da amostra A10 (representada na figura 5.15), uma vez que as condições de humidade exigidas estão mais próximas da humidade normal do laboratório, cerca de 40 - 45%. Além disso, a amostra A10 apresenta um desvio padrão menor para o diâmetro das suas fibras, o que indica que as fibras apresentam uma distribuição de diâmetros mais uniforme.

Tabela 5.2-Diâmetros médios das fibras das amostras selecionadas para SEM.

Amostra	Diâmetro médio (nm)
A1	387 ± 98
A2	329 ± 119
A3	308 ± 90
A4	345 ± 113
A5	375± 113
A6	366 ± 109
A7	468 ± 110
A8	485 ± 136
A9	340 ± 95
A10	299 ± 68
A11	392 ± 105

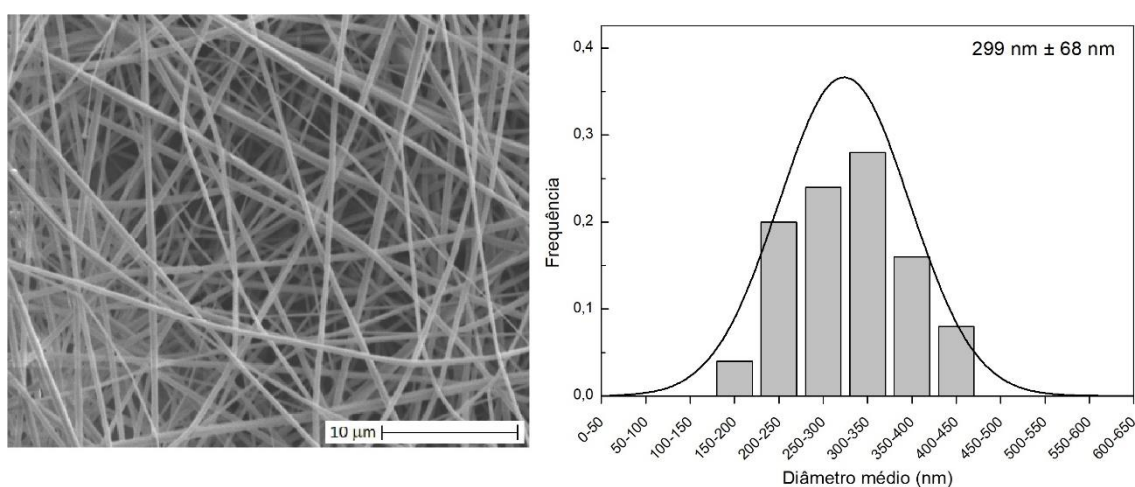


Figura 5.15-Imagem SEM de fibras produzidas por eletrofiação para as condições da amostra A10 (humidade de 40%; caudal de 0.15 ml/h; distância agulha-coletor igual a 17 cm; potencial aplicado de 20 kV) e respetiva distribuição de diâmetros.

5.2.2 Adsorção das MNPs à membrana

Após se ter escolhido os parâmetros mais adequados à formação das nanofibras, seguiu-se a produção das membranas. Após um tempo de deposição de 6 horas, as membranas apresentaram um formato circular, com uma espessura média de $65 \pm 4 \mu\text{m}$, sendo essa espessura ligeiramente maior no centro.

Como o intuito de incorporar as MNPs nas membranas, foram recortados pedaços de membrana, com dimensões 2.5×1.5 cm, e colocados em adsorção em soluções com diferentes concentrações de NPs-AO e NPs-DMSA. A figura 5.16 mostra o resultado após 24 horas de adsorção, em soluções de NPs-AO com concentrações de 0.1 mg.ml^{-1} , 0.5 mg.ml^{-1} , 1.0 mg.ml^{-1} , 2.0 mg.ml^{-1} , 3.0 mg.ml^{-1} , 4.0 mg.ml^{-1} , 5.0 mg.ml^{-1} e 6.34 mg.ml^{-1} . Pode-se verificar que quanto mais elevada a concentração da solução, mais escura se apresenta a membrana, sendo um indicador de que existiu mais adsorção nas soluções mais concentradas, tal como era espectável.

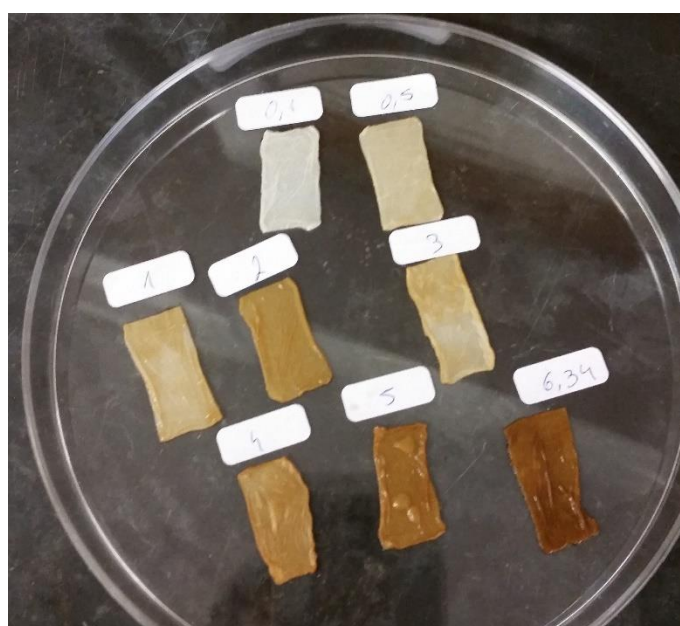


Figura 5.16- Resultado após as membranas de AC estarem 24 horas em adsorção em soluções com diferentes concentrações de NPs-AO.

Pode-se verificar a partir da figura 5.17 que as MNPs aderem às fibras em maior quantidade quando a estabilização é efetuada com DMSA, embora a distribuição das MNPs seja mais uniforme quando o revestimento é efetuado com AO. Estes dados são consistentes com as imagens SEM de alta resolução. É notável a maior quantidade de MNPs adsorvidas às fibras na figura 5.20 e figura 5.21, correspondentes à adsorção em soluções que contêm NPs-DMSA, quando comparado com a quantidade de MNPs adsorvidas às fibras na figura 5.18 e figura 5.19, correspondentes à adsorção para as soluções que contêm NPs-AO

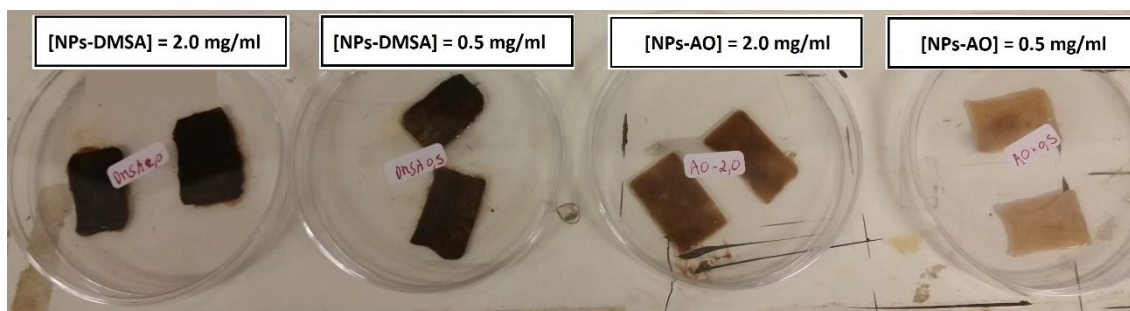


Figura 5.17- Resultado após as membranas de AC estarem 24 horas em adsorção em soluções de NPs com diferentes revestimentos (DMSA e AO) mas com a mesma concentração.

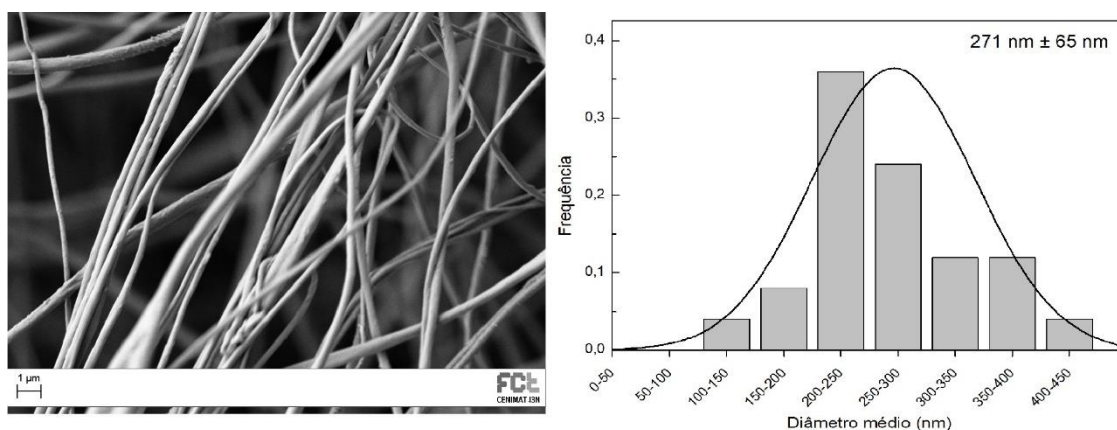


Figura 5.18- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de [NPs - AO] = 0.5 mg.ml⁻¹.

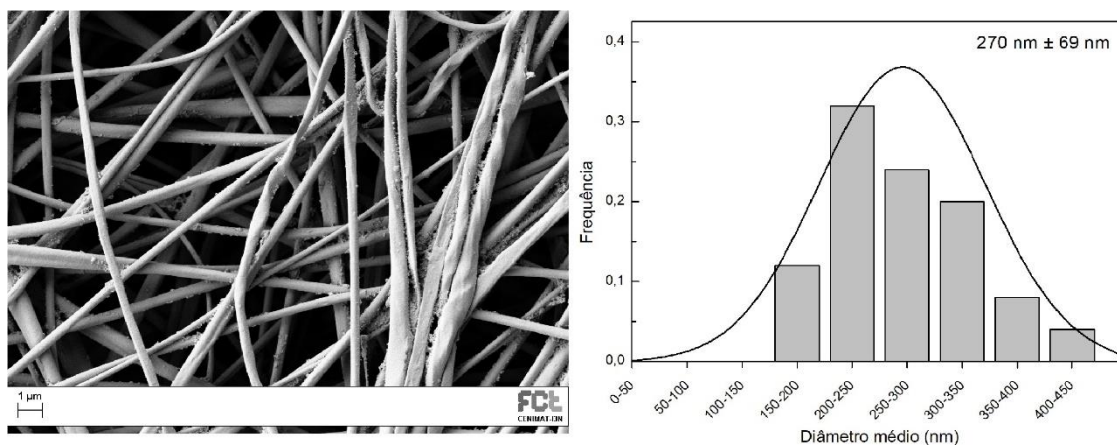


Figura 5.19- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de [NPs - AO] = 2.0 mg.ml⁻¹.

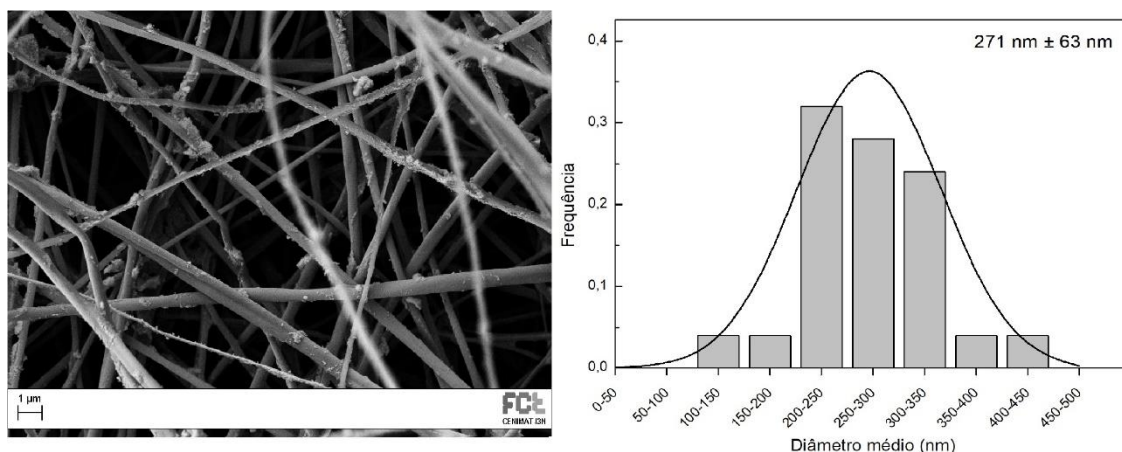


Figura 5.20- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de $[\text{NPs} - \text{DMSA}] = 0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$.

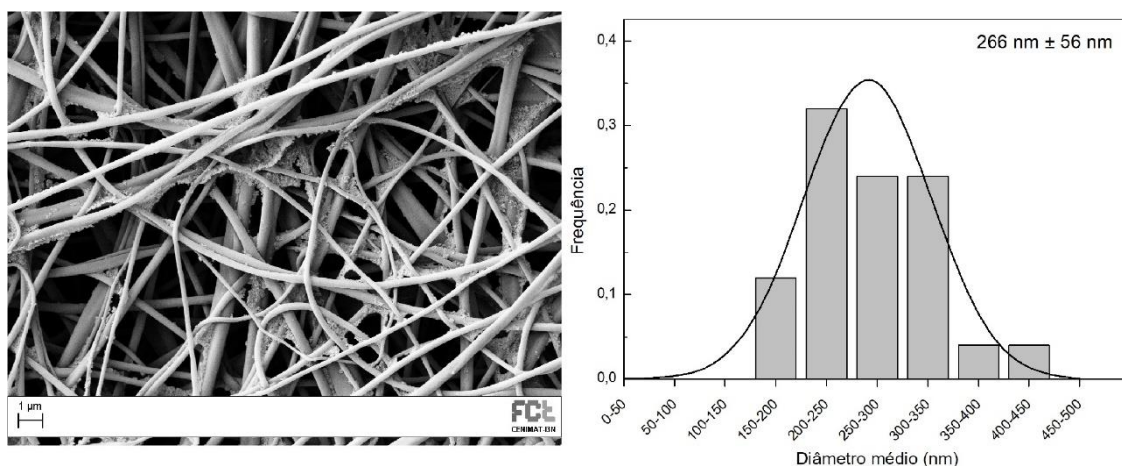


Figura 5.21- Membrana de AC após 24 horas em adsorção numa solução de $[\text{NPs} - \text{DMSA}] = 2.0 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Pode-se também verificar que colocar as membranas em adsorção não altera a morfologia das fibras nem o seu diâmetro médio, de cerca de 270 nm. Este valor difere ligeiramente do valor calculado para o diâmetro médio das fibras antes de ocorrer a adsorção (299 nm). No entanto, essa diferença pode ser explicada pelo facto de que as imagens SEM através do qual foram calculados os diâmetros médios das fibras antes de serem colocadas em adsorção, apresentarem uma resolução inferior as imagens SEM para as membranas após a adsorção.

Acoplado ao SEM, o sistema de EDS (*Energy Dispersive System*) possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios-X característicos [49]. Na figura 5.22 (A) e (B) pode-se observar imagens SEM para membranas de acetato de celulose após adsorção em soluções de NPs-AO e

NPs-DMSA, respetivamente. Associadas a essas imagens SEM, encontra-se o mapeamento dos seus elementos químicos, através da análise EDS. Verifica-se a presença de carbono, oxigénio e ferro. A presença do elemento ferro comprova que a incorporação das MNPs foi conseguida com sucesso.

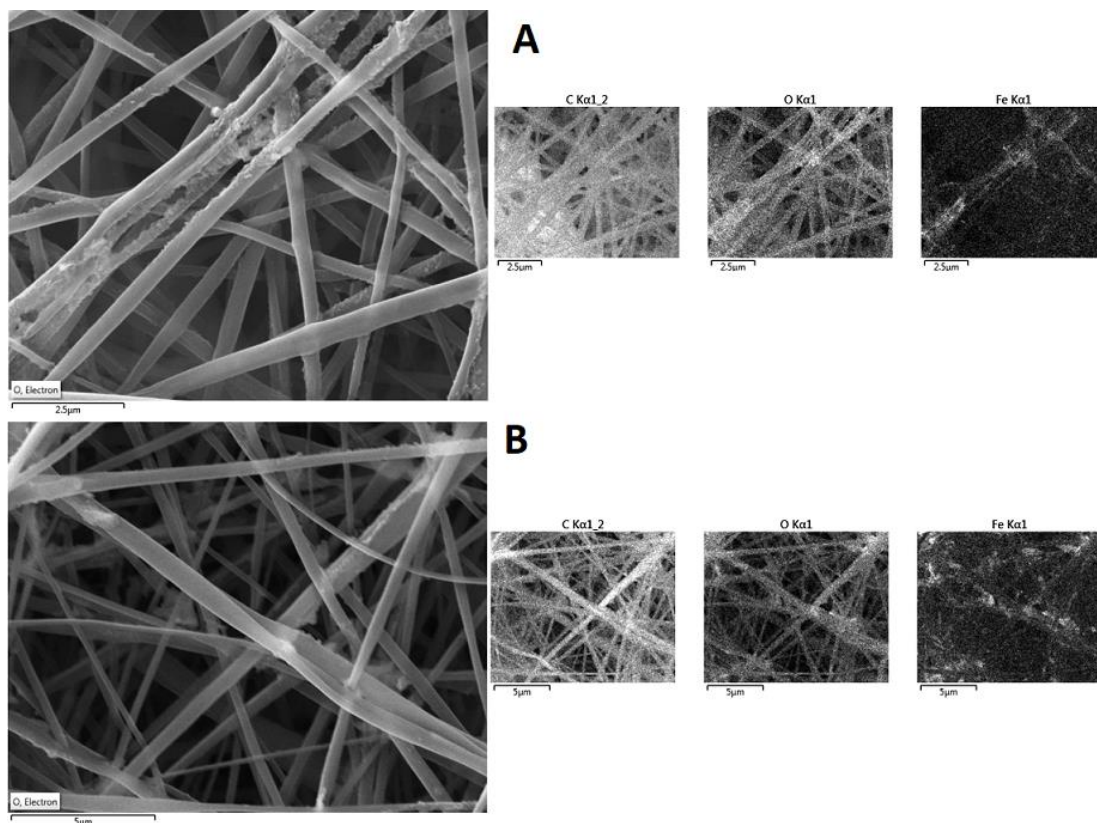


Figura 5.22- Análise EDS para membranas de AC após adsorção numa solução de (A) NPs - AO com concentração de 6.34 mg.ml⁻¹ (B) NPs - DMSA com concentração de 1.0 mg.ml⁻¹.

5.2.3 Eletrofiação coloidal

Outra estratégia adotada para incorporar as MNPs nas fibras de acetato de celulose passa por adicionar as nanopartículas à solução precursora para eletrofiação. Assim, em vez do sistema de solventes para o acetato de celulose ser acetona e N,N- dimetilacetamida (2:1), optou-se por utilizar um sistema que incluísse 63% de acetona, 32% de N, N- dimetilacetamida e uma percentagem de 5% da solução de NPs-AO ou NPs-DMSA. No entanto, a adição das MNPs à solução precursora altera a viscosidade da solução, e consequentemente as condições ótimas para eletrofiação também sofrem alterações.

Verificou-se que para a incorporação das NPs-AO na solução precursora, uma concentração de AC de 12% m/m não resultava em fibras uniformes. Existiu uma acumulação contínua de solução na ponta da agulha metálica, devido a uma viscosidade elevada. Assim, baixou-se a concentração do polímero para 11% m/m e determinou-se os parâmetros ótimos para eletrofiação, resumidos na tabela 5.3. No caso da incorporação das NPs-DMSA na solução precursora, foi mesmo necessário baixar a concentração do polímero para 10% m/m.

Tabela 5.3- Parâmetros ótimos para eletrofiação com a incorporação de NPs-AO e NPs-DMSA na solução precursora.

Revestimento	Temperatura (°C)	Humidade (%)	Caudal (ml/h)	Distância (cm)	Potencial (kV)
NPs-AO	25-27	40-45	0.15-0.25	17-20	20
NPs-DMSA	23-26	38-45	0.15-0.30	15-20	20

A partir da imagem SEM representada na figura 5.23, conclui-se que a adição das NPs-AO à solução precursora não altera a morfologia das fibras, preservando a sua forma cilíndrica, o mesmo se passa com a adição de NPs-DMSA à solução precursora. A diminuição do diâmetro médio das fibras resulta do facto de se utilizar uma distância agulha – coletor de 20 cm, enquanto que sem a adição das NPs-AO, essa distância era de 17 cm. Para o caso da adição de NPs-DMSA à solução precursora, a distância entre a agulha e o coletor manteve-se nos 17 cm, com um potencial aplicado de 20 kV, um caudal de 0.2 ml.h⁻¹ e humidade de 40%.

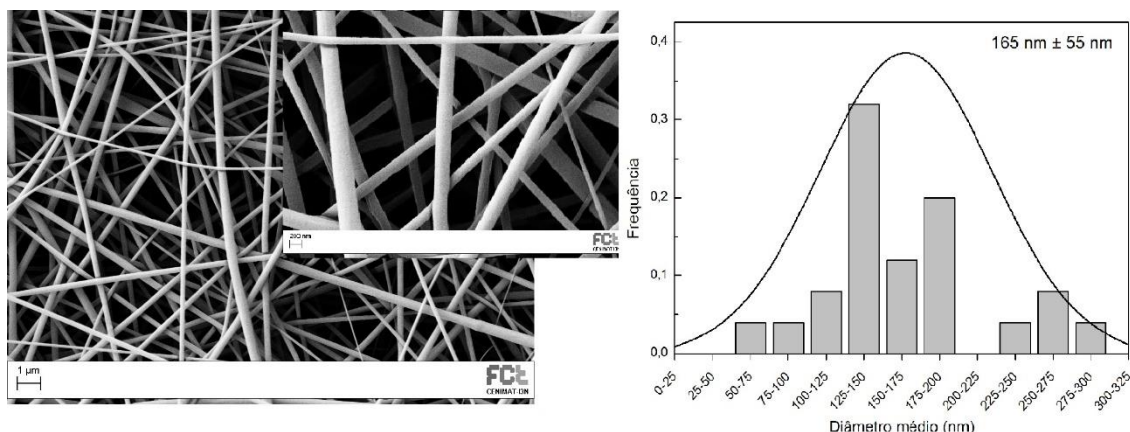


Figura 5.23-Imagem SEM para eletrofiação com NPs-AO na solução precursora e respectiva distribuição de diâmetros. Condições: 25.8 °C; humidade 44%; caudal de 0.25 mg.ml⁻¹; distância agulha-coletor de 20 cm; potencial de 20 kV.

Com o intuito de confirmar se a incorporação das NPs nas fibras foi efetuada com sucesso, submeteu-se as membranas à microscopia eletrónica de transmissão - TEM. Na figura 5.24 estão presentes as imagens TEM das membranas, através das quais é possível concluir que as NPs foram incorporadas nas nanofibras com sucesso. Contrariamente à incorporação por adsorção, onde as NPs aderem à superfície das fibras com empilhamento na direção radial, quando se adiciona as NPs à solução precursora, estas vão se localizar no interior das fibras.

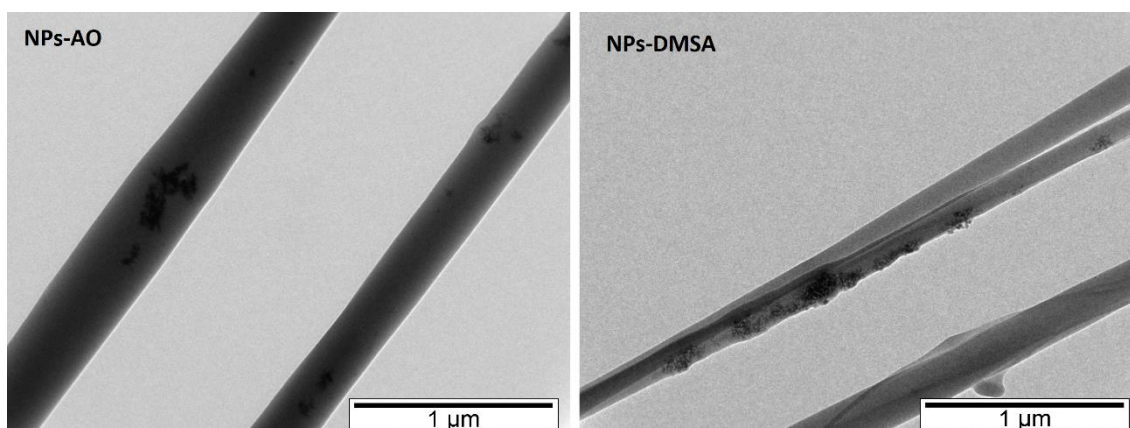


Figura 5.24- Imagens TEM para fibras de AC com incorporação de NPs-AO (esquerda) e NPs-DMSA (direita).

5.2.4 Ensaio de tração

A figura 5.25 mostra as curvas de tensão-deformação das amostras dos vários tipos de membranas de AC. As amostras exibiram um comportamento mecânico semelhante

sob forças de tração, característico de materiais frágeis, apresentando uma zona de deformação elástica e uma zona de deformação plástica muito reduzida. No início das curvas (<6% deformação) ocorre um aumento proporcional da deformação com a tensão aplicada. Este comportamento elástico é descrito pela lei de Hooke, e corresponde a deformações que são recuperáveis após a remoção da carga [50].

Com o aumento da deformação, as curvas entram num regime de deformação plástica, que persiste mesmo após se retirarem as forças que a originaram. No entanto, a deformação plástica nas membranas que têm MNPs incorporadas é praticamente desprezável, uma vez que a rotura da membrana ocorre rapidamente. Apenas a membrana de AC 12% m/m sem MNPs apresenta alguma deformação plástica a considerar, para valores de deformação entre 8% e 18%, aproximadamente.

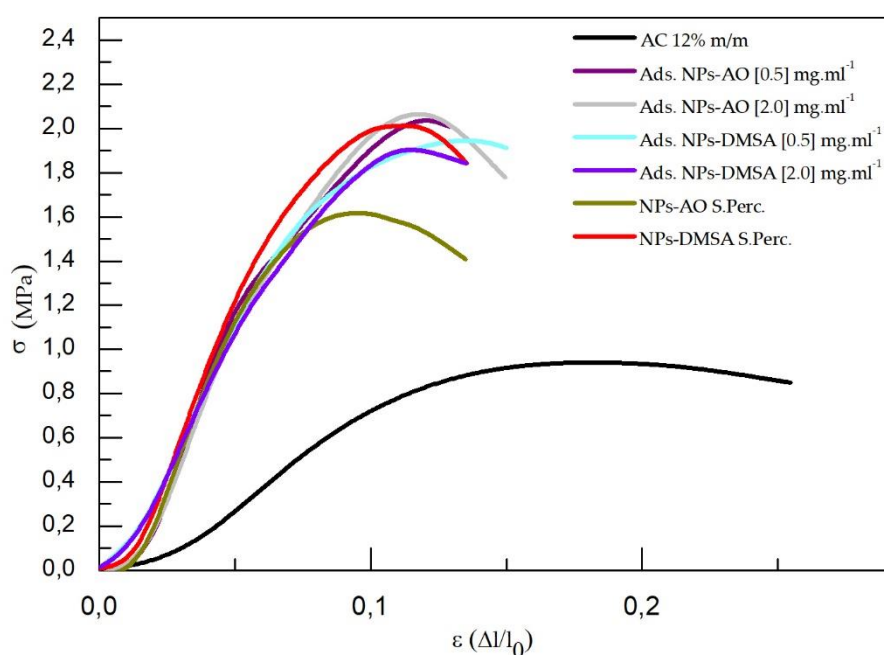


Figura 5.25- Curvas de tração para os vários tipos de membranas de AC: AC 12% m/m; AC com NPs-AO ou NPs-DMSA na solução precursora de eletrofiliação; AC em adsorção em soluções de NPs-AO ou NPs-DMSA com diferentes concentrações. As curvas representam uma média dos 10 ensaios realizados para cada tipo de membrana.

A partir das curvas dos ensaios de tração foram retirados três parâmetros que caracterizam as membranas: o Módulo de Young (E), o qual caracteriza a resistência mecânica do material; a tensão limite de elasticidade ($\sigma_{L.E}$), que é a tensão que separa o regime elástico (zona linear) do regime plástico; a tensão de rutura (σ_{ROT}), para a qual

ocorre a rotura da amostra e que corresponde a tensão máxima. Os resultados calculados para as diferentes membranas, encontram-se representados na figura 5.26, sendo que o módulo de Young foi calculado a partir do declive da reta de regressão linear correspondente à zona elástica ($\epsilon < 0.06$).

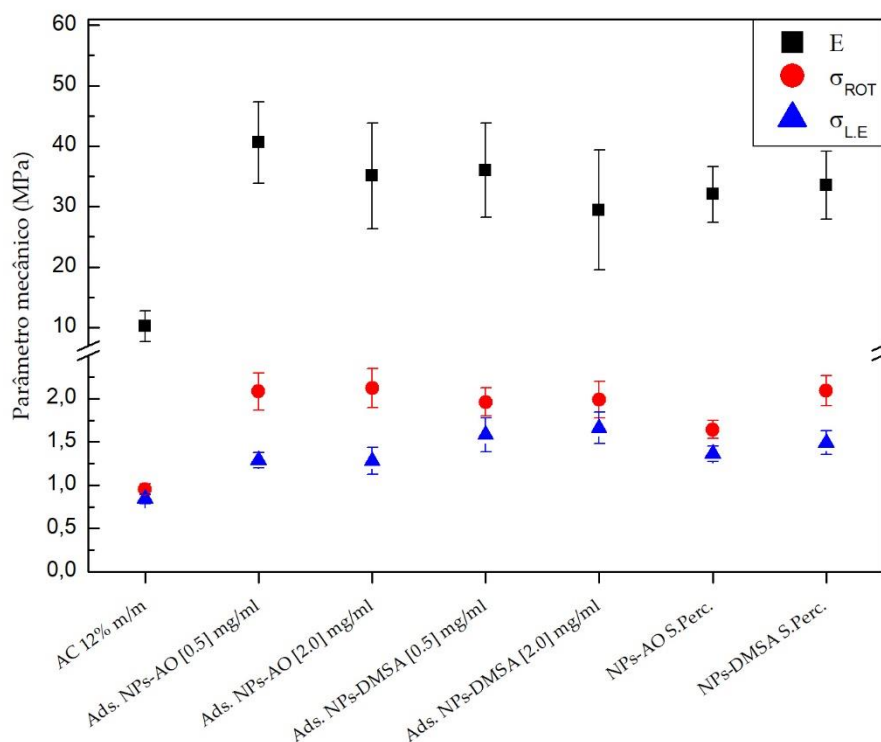


Figura 5.26- Diferentes parâmetros calculados para cada tipo de membrana: módulo de Young (preto), tensão de rotura (vermelho) e tensão limite de elasticidade (azul).

É perceptível que a adição de MNPs afete os parâmetros mecânicos das membranas, uma vez que a superfície das fibras passa a apresentar uma rugosidade, o que aumenta a força de atrito entre as mesmas, dificultando o seu deslizamento quando submetidas a forças de estiramento. Assim, o material apresenta maior rigidez quando submetido a forças de tração, aumentando o seu módulo de Young, tal como pode ser verificado na figura 5.26. Além disso, podemos verificar que a resposta mecânica das membranas é independente do tipo de revestimento das NPs, uma vez que o módulo de Young aumenta na mesma proporção para todos os tipos de membrana que contêm NPs, assumindo valores próximos de 35 MPa. Embora a tensão de rotura para a membrana que contem NPs-AO por adição à solução precursora, seja inferior às restantes membranas, é resultado do facto de o seu diâmetro médio das fibras ser inferior, quando comparado com as restantes membranas, tal como se pode ser verificar na tabela 5.4.

Tabela 5.4- Diâmetro médio das fibras para os vários tipos de membranas submetidas aos ensaios de tração.

Membrana	Diâmetro médio (nm)
AC 12% m/m	299 ± 68
Ads. NPs-AO [0.5] mg/ml	271 ± 65
Ads. NPs-AO [2.0] mg/ml	270 ± 69
NPs-AO S. Perc.	165 ± 55
Ads. NPs-DMSA [0.5] mg/ml	271± 63
Ads. NPs-DMSA [2.0] mg/ml	266 ± 56
NPs-DMSA S. Perc.	263 ± 36

Em suma, conclui-se que a incorporação das MNPs tem um efeito de reforço nas membranas, aumentando o seu módulo de Young.

5.3 Ensaios de citotoxicidade

Com o intuito de averiguar a biocompatibilidade das membranas de acetato de celulose que incorporam magnetite através de fenómenos de adsorção, ou da adição das NPs à solução precursora de eletrofiação, avaliou-se o potencial efeito citotóxico que essas membranas têm em células Vero, através do método do extrato (norma ISSO 10993 - 5).

Os resultados encontram-se na figura 5.27, a qual expressa a viabilidade celular, em %, calculada através da seguinte expressão:

$$Viabilidade\ celular = \frac{n.^{\circ}\ de\ células\ em\ contacto\ indireto\ com\ a\ membrana}{n.^{\circ}\ de\ células\ do\ controlo\ negativo} \times 100 \quad Eq. 5.2$$

Os ensaios foram realizados para diferentes concentrações de extrato: 5 mg.ml⁻¹; 2.5 mg.ml⁻¹; 1.25 mg.ml⁻¹; 0.625 mg.ml⁻¹. Para as concentrações de 2.5 mg.ml⁻¹, 1.25 mg.ml⁻¹ e 0.625 mg.ml⁻¹, todos os ensaios revelaram ausência de citotoxicidade, com viabilidades celulares acima de 96%. No entanto, para a membrana de AC colocada em adsorção numa solução de NPs-DMSA com concentração de 2.0 mg.ml⁻¹, o extrato obtido para a concentração de substrato de 5.0 mg.ml⁻¹ revelou uma viabilidade celular de apenas 76% o que leva a caracterizar este extrato como moderadamente citotóxico.

Através da análise dos dados, pode-se verificar que para as membranas de acetato de celulose no seu estado puro, isto é, sem NPs, os ensaios revelaram ausência de citotoxicidade. Assim, dada a biocompatibilidade do acetato de celulose, a citotoxicidade das membranas com magnetite incorporada, vai depender essencialmente da quantidade de NPs que esteja incorporada nas membranas. Tal como referido num subcapítulo anterior (5.2.2 - 5.2.2 Adsorção das MNPs à membrana), as NPs revestidas com DMSA são adsorvidas em maior quantidade nas nanofibras de AC, quando comparadas com as NPs revestidas com AO. Estes resultados vão ao encontro de outros estudos efetuados para determinar a citotoxicidade das NPs-DMSA em solução, onde se verificou que a viabilidade celular tende a diminuir gradualmente com o aumento da concentração de NPs-DMSA, atingindo valores de cerca de 60% para concentrações de 0.7 mg.ml^{-1} [51], [52].

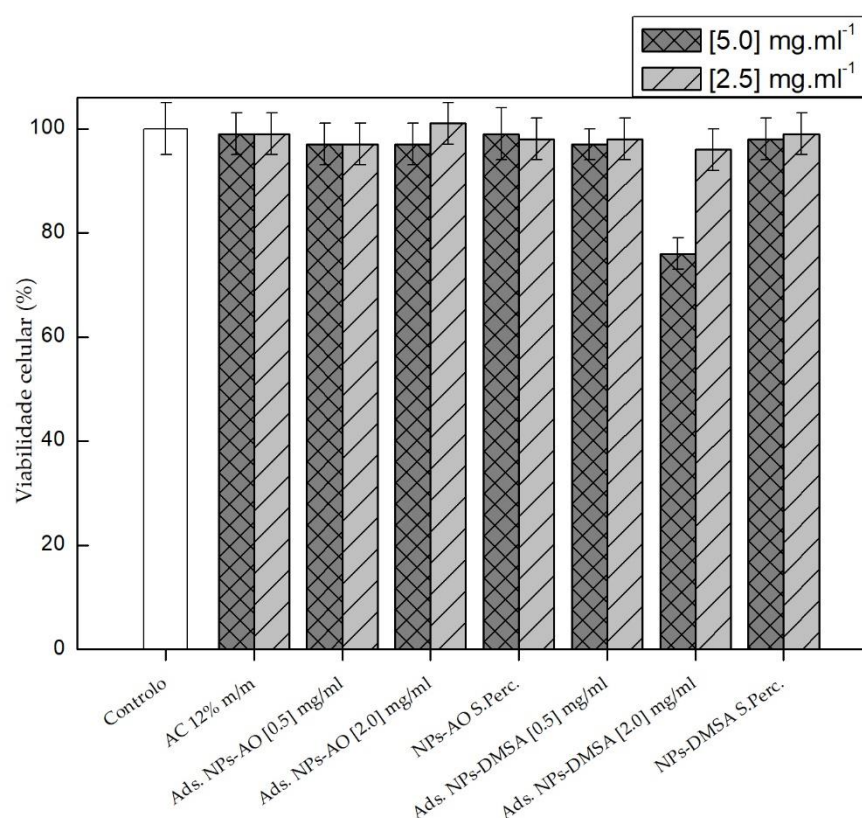


Figura 5.27- Viabilidade celular de células Vero após 24 h de exposição aos vários tipos de membranas: AC 12% m/m; AC com NPs-AO ou NPs-DMSA na solução precursora de eletrofiação; AC em adsorção em soluções de NPs-AO ou NPs-DMSA com diferentes concentrações.

Em suma, o facto de um extrato causar citotoxicidade, demonstra que as NPs podem ser citotóxicas quando presentes no meio em concentração elevada. Deste modo, a concentração, a forma de incorporação nas fibras e taxa de libertação para o meio devem ser cuidadosamente estudadas e ajustadas, para evitar efeitos citotóxicos e garantir a biocompatibilidade das membranas. No entanto, para as condições utilizadas neste trabalho, os níveis de viabilidade celular não atingem valores críticos, à exceção de um extrato todas as membranas revelaram ausência de citotoxicidade.

5.4 Ensaios de hipertermia magnética

Os ensaios de hipertermia magnética foram realizados para avaliar a capacidade de aquecimento das IONPs incorporadas nas membranas de acetato de celulose, quer por adsorção, quer por adição à solução percursora de eletrofiação.

A figura 5.28 representa a variação de temperatura para as membranas de AC com MNPS incorporadas. Foram realizados pelo menos 3 ensaios para cada tipo de membrana, durante 10 minutos, com uma densidade de fluxo magnético de 300 Gauss e uma frequência de 418.5 kHz. Pode-se verificar que a maior variação de temperatura ocorreu para as membranas colocadas em adsorção em soluções de NPs-DMSA com concentrações de 0.5 mg.ml⁻¹ e 2.0 mg.ml⁻¹, sendo essa variação média de temperatura de 5.1 °C e 11.5 °C, respetivamente. Deste modo, os resultados são coerentes com a maior capacidade de adsorção das NPs - DMSA às fibras de acetato de celulose, quando comparada com a capacidade de adsorção das NPs-AO, ou seja, as amostras que apresentaram maior variação de temperatura são as amostras que conseguiram incorporar maior quantidade de NPs.

Se a temperatura corporal normal for considerada como sendo 37 °C, uma variação de temperatura de cinco graus é suficiente para atingir um valor terapêutico para o tecido cancerígeno (cerca de 42 °C). Dentro das condições testadas, apenas as membranas colocadas em adsorção em soluções de NPs-DMSA permitem um aumento de pelo menos cinco graus. No entanto, para as membranas colocadas em adsorção em soluções de NPs-AO, as quais apresentam uma variação de temperatura linear em função do tempo, será também possível atingir o aquecimento pretendido caso se aumente o tempo do ensaio. As membranas para as quais foram adicionadas as NPs à

solução precursora de eletrofiação, são as que apresentam menor variação de temperatura. Este aumento pouco significativo, de cerca de 0.6 °C, é coerente com as baixas percentagens de NPs presentes nas membranas (cerca de 0.3% da massa de polímero).

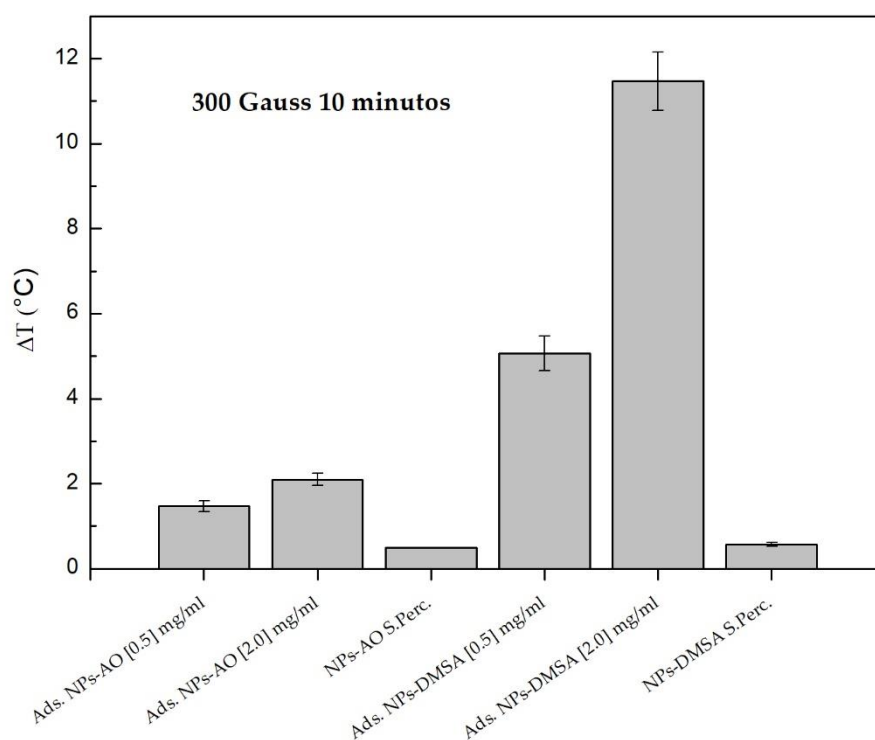


Figura 5.28- Variação de temperatura para os vários tipos de membranas de AC com MNPs incorporadas quer por adsorção, quer por adição à solução precursora de eletrofiação. Os ensaios foram realizados durante 10 minutos para uma densidade de fluxo magnético de 300 Gauss.

As membranas colocadas em adsorção numa solução de NPs-DMSA com concentração de 0.5 mg.ml⁻¹, revelam-se ser as mais promissoras para uso em hipertermia magnética, tendo em conta o calor gerado e a ausência de citotoxicidade.



6 Considerações finais

6.1 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo central a produção de membranas de acetato de celulose através da técnica de eletrofiação, e a sua posterior funcionalização com NPs de magnetite, de modo a que possam ser utilizadas na terapia de cancro através de hipertermia magnética.

O interesse das NPs de magnetite surge devido às suas propriedades superparamagnéticas à temperatura ambiente, e à sua biocompatibilidade. Estas NPs são capazes de gerar calor a partir de um campo magnético alternado, através das relaxações de Néel e Browniana, sendo a relaxação de Néel devida à rotação do dipolo interno da nanopartícula, e a relaxação Browniana referente à rotação física da nanopartícula.

As IONPs foram obtidas por precipitação química à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se a sua estabilização com AO e DMSA para evitar a sua agregação, dada a sua elevada razão entre a área superficial e o volume, juntamente com a força de atração dipolo-dipolo. Os resultados de FTIR confirmaram a ligação do tensioativo às NPs, enquanto os resultados de DLS confirmaram a estabilidade das NPs após o seu revestimento. De um modo geral, verificou-se haver concordância entre o tamanho médio da cristalite das NPs, calculado através dos dados obtidos por DRX (equação de Scherrer), e o diâmetro médio das NPs, calculado a partir das imagens TEM.

Esses valores foram próximos de 10 nm, o que à partida pressupõe as propriedades superparamagnéticas das NPs. Essas propriedades foram confirmadas pela análise VSM, quer para as NPs nuas, quer para as NPs revestidas. Todas as amostras apresentaram um comportamento magnético semelhante, com ausência de coercividade e magnetização remanescente. No entanto, a magnetização de saturação das NPS-AO foi ligeiramente inferior, dado o efeito que o tensioativo tem na superfície das partículas, para uma concentração de 64 mM.

Um dos principais obstáculos na aplicação da hipertermia magnética é que é necessária uma grande concentração de nanopartículas para obter o aumento de temperatura necessário, quer *in vitro*, ou especialmente *in vivo*, o que até ao momento limitou a sua aplicação através da injeção direta em tumores sólidos [53]. Deste modo, e indo de encontro ao objetivo deste trabalho, novos sistemas de entrega devem ser implementados, de modo a minimizar o efeito citotóxico que pode resultar da introdução direta das NPs. Para tal, incorporaram-se as NPs nas membranas de acetato de celulose, as quais podem servir como meio de suporte para uma entrega mais eficiente das NPs e permitir uma melhor distribuição espacial das NPs em torno do tumor.

A ligação entre as NPs e as membranas foi efetuada através de dois métodos diferentes, através de adsorção ou da sua adição à solução precursora de eletrofição. Os resultados de TEM comprovaram a incorporação das NPs nas fibras quando adicionadas à solução precursora, enquanto os resultados de SEM mostraram que a adsorção também ocorreu com sucesso. Esses dados foram corroborados pela análise EDS, que identificou o elemento Fe nas membranas.

O estudo da funcionalização das membranas por adsorção, permitiu concluir que para as NPs-DMSA a adsorção ocorre mais eficazmente, isto é, para duas membranas colocadas em soluções de NPs-AO e NPs-DMSA com a mesma concentração, as nanopartículas são adsorvidas em maior quantidade quando o revestimento é feito com DMSA. Embora numa fase inicial fosse testada a adsorção para concentrações numa gama de 0.1 até 6.34 mg.ml⁻¹ para as soluções de NPs-AO, e numa gama de 0.1 até 3.65 mg.ml⁻¹ para as soluções de NPs-DMSA, de modo a ser possível uma comparação mais rigorosa das propriedades destas membranas, decidiu-se trabalhar apenas com

duas concentrações distintas para cada membrana, sendo essas concentrações de 0.5 e 2.0 mg.ml⁻¹.

Os resultados dos ensaios de tração mostraram que a incorporação das MNPs nas matrizes poliméricas promovem o aumento da sua rigidez, diminuindo a elongação das membranas, mas aumentando o seu módulo de Young e a sua tensão de rotura. De um modo geral, a introdução das MNPs tem um efeito de reforço nas membranas.

Os ensaios de hipertermia magnética efetuados para os vários tipos de membranas de AC, mostraram que é possível atingir uma variação de temperatura suficiente para se entrar num estado de hipertermia (42 °C). No entanto, os efeitos citotóxicos estudados em células do tipo *Vero*, mostraram que deve haver um estudo rigoroso e criterioso do efeito que elevadas quantidades de NPs podem causar, nomeadamente na diminuição da viabilidade celular.

De um modo geral, pode-se dizer que os objetivos gerais deste trabalho foram atingidos. Dentro das membranas estudadas, destaca-se a membrana colocada em adsorção numa solução de NPs-DMSA com concentração de 0.5 mg.ml⁻¹, permitindo atingir um aquecimento de 5.1 ± 0.4 °C, durante 10 minutos com uma densidade de fluxo magnético de 300 Gauss, e revelando ausência de citotoxicidade nos testes realizados.

6.2 Sugestão de investigação futura

Os resultados obtidos apontam para as potencialidades das membranas funcionalizadas com Fe₃O₄, concretamente na sua aplicação em tratamento de cancro por hipertermia magnética. No entanto, ainda é necessário aprofundar o estudo até que se possa aplicar em meio clínico.

O principal foco de estudo deverá ser o efeito citotóxico que as membranas podem apresentar. Para tal, um estudo da quantidade de NPs que as membranas podem incorporar, a taxa de libertação de NPs para o meio após os ensaios de hipertermia, e o efeito dos tensioativos na citotoxicidade devem ser criteriosamente estudados de modo a assegurar a biocompatibilidade das membranas.

Tendo em conta os resultados obtidos para as variações de temperatura resultantes dos ensaios de hipertermia, seria também importante estudar o efeito que o aumento da quantidade de NPs adicionadas à solução percursora causaria nessa variação de

temperatura. Neste estudo, apenas com uma percentagem de NPs de 0.26% em relação a massa de polímero, foram registadas variações de temperatura na ordem dos 0.6 °C.

Por último, novas abordagens de incorporação das NPs nas membranas, como técnicas *in situ* poderiam ser aplicadas. Estudando-se posteriormente qual o método mais eficiente de incorporação, através da avaliação da taxa de libertação para o meio.

Referências Bibliográficas

- [1] T. C. Lin, F. H. Lin, and J. C. Lin, "In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 7, pp. 2704–2711, 2012.
- [2] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, *et al.*, "Global Cancer Statistics, 2012," *CA a cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [3] A. Yadollahpour, S. A. Hosseini, and A. Yadollahpour, "Magnetic nanoparticle based hyperthermia: A review of the physiochemical properties and synthesis methods," *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 242–246, 2016.
- [4] J. Maximilien, S. Beyazit, C. Rossi, *et al.*, "Nanoparticles in biomedical applications," *Bioanal. Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 177–210, 2016.
- [5] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss, *et al.*, "Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 21266–21305, 2013.
- [6] T. Kobayashi, "Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles," *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 11, pp. 1342–1347, 2011.
- [7] H. J. Lee, S. J. Lee, S. Uthaman, *et al.*, "Biomedical applications of magnetically functionalized organic/inorganic hybrid nanofibers," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 13661–13677, 2015.
- [8] Y. Fan, Z. Wei, H.-M. Huang, *et al.*, "Decoration of Electrospun Nanofibers with Magnetic Nanoparticles via Electrospinning and Sol-gel Process," *Chem. Res. Chinese Univ.*, vol. 26, no. 5, pp. 847–850, 2010.
- [9] A. Amarjargal, L. D. Tijing, C. H. Park, *et al.*, "Controlled assembly of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on electrospun PU nanofibrous membrane: A novel heat-generating substrate for magnetic hyperthermia application," *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 12, pp. 3796–3805, 2013.
- [10] Y. Zhong, V. Leung, L. Yuqin Wan, *et al.*, "Electrospun magnetic nanofibre mats - A new bondable biomaterial using remotely activated magnetic heating," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 380, pp. 330–334, 2015.
- [11] T.-C. Lin, F.-H. Lin, and J.-C. Lin, "In vitro characterization of magnetic electrospun IDA-grafted chitosan nanofiber composite for hyperthermic tumor cell treatment," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 24, no. 9, pp. 1152–1163, 2013.
- [12] Y. H. Chen, C. H. Cheng, W. J. Chang, *et al.*, "Studies of magnetic alginate-based electrospun matrices crosslinked with different methods for potential hyperthermia treatment," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 338–349, 2016.
- [13] S. dos S. Cunha, "Aplicação de Nanopartículas Magnéticas em Hipertermia Novembro 2014," Instituto Politécnico de Bragança-, 2014.
- [14] T. C. Coelho, "DESENVOLVIMENTO DE FLUIDOS E FILMES MAGNÉTICOS A PARTIR DE ÓXIDOS DE FERRO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS," Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- [15] D. L. Leslie-pelecky and R. D. Rieke, "Magnetic Properties of Nanostructured Materials," *Chem. Mater.*, vol. 4756, no. 96, pp. 1770–1783, 1996.
- [16] P. I. S. Pereira, "Chitosan-based magnetic nanoparticles for osteosarcoma theranostic," Universidade Nova de Lisboa-FCT.

- [17] J. Guo, X. Ye, W. Liu, *et al.*, "Preparation and characterization of poly (acrylonitrile-co-acrylic acid) nanofibrous composites with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 15, pp. 1326–1328, 2009.
- [18] S. Hasan, "A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types," *Res. J. Recent Sci.*, vol. 4, no. February 2015, pp. 1–4, 2015.
- [19] P. Majewski and B. Thierry, "Functionalized Magnetite Nanoparticles - Synthesis, Properties, and Bio-Applications," *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 32, no. 3, pp. 203–215, 2007.
- [20] X.-Y. Ye, Z.-M. Liu, Z.-G. Wang, *et al.*, "Preparation and characterization of magnetic nanofibrous composite membranes with catalytic activity," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 21, pp. 1810–1813, 2009.
- [21] A. Chicheł, J. Skowronek, M. Kubaszewska, *et al.*, "Hyperthermia - Description of a method and a review of clinical applications," *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 12, no. 5, pp. 267–275, 2007.
- [22] M. S. A. Darwish, N. H. A. Nguyen, A. Ševců, *et al.*, "Dual-modality self-heating and antibacterial polymer-coated nanoparticles for magnetic hyperthermia," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 63, pp. 88–95, 2016.
- [23] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, *et al.*, "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, no. 2, p. 23501, 2015.
- [24] A. G. F. Alves, "Nanopartículas de óxidos magnéticos do tipo magnetite para aplicação em hipertermia," Universidade de Lisboa, 2014.
- [25] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, *et al.*, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, no. 15, pp. 2223–2253, 2003.
- [26] D. Zhang, A. B. Karki, D. Rutman, *et al.*, "Electrospun polyacrylonitrile nanocomposite fibers reinforced with Fe₃O₄ nanoparticles: Fabrication and property analysis," *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 17, pp. 4189–4198, 2009.
- [27] S. Agarwal, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications," *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 26, pp. 5603–5621, 2008.
- [28] D. H. Reneker and A. L. Yarin, "Electrospinning jets and polymer nanofibers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 10, pp. 2387–2425, 2008.
- [29] L. M. B. Oliveira, "Automatização e controlo de um sistema de electrospinning," Universidade do Minho, 2011.
- [30] J. Guo, X. Ye, W. Liu, *et al.*, "Preparation and characterization of poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) nanofibrous composites with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 15, pp. 1326–1328, 2009.
- [31] S. Wang, C. Wang, B. Zhang, *et al.*, "Preparation of Fe₃O₄/PVA nanofibers via combining in-situ composite with electrospinning," *Mater. Lett.*, vol. 64, no. 1, pp. 9–11, 2010.
- [32] L. Burke, C. J. Mortimer, D. J. Curtis, *et al.*, "In-situ synthesis of magnetic iron-oxide nanoparticle-nanofibre composites using electrospinning," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, pp. 512–519, 2017.
- [33] A. R. K. Sasikala, A. R. Unnithan, Y. H. Yun, *et al.*, "An implantable smart magnetic nanofiber device for endoscopic hyperthermia treatment and tumor-triggered controlled drug release," *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 122–133, 2016.

- [34] G. Gnanaprakash, J. Philip, T. Jayakumar, *et al.*, "Effect of digestion time and alkali addition rate on physical properties of magnetite nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 28, pp. 7978–7986, 2007.
- [35] M. Talelli, C. J. F. Rijcken, T. Lammers, *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: Toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery," *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 2060–2067, 2009.
- [36] G. C. Pereira, "Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética," 2016.
- [37] T. Saranya, K. Parasuraman, M. Anbarasu, *et al.*, "XRD , FT-IR and SEM Study of Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles Prepared by Hydrothermal Method," *Nano Vis.*, vol. 5, no. 4, pp. 149–154, 2015.
- [38] M. Mahdavi, M. Bin Ahmad, J. Haron, *et al.*, "Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications," *Molecules*, vol. 18, pp. 7533–7548, 2013.
- [39] J. Lee, Y. Choa, J. Kim, *et al.*, "Comparison of the Magnetic Properties for the Surface-Modified Magnetite," *Trans. Magn.*, vol. 47, no. 10, pp. 2874–2877, 2011.
- [40] S. I. C. J. Palma, M. Marciello, A. Carvalho, *et al.*, "Journal of Colloid and Interface Science Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 437, pp. 147–155, 2015.
- [41] C. R. A. Valois, J. M. Braz, E. S. Nunes, *et al.*, "Biomaterials The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a $\alpha_5\beta_1$ integrin-dependent pathway," *Biomaterials*, vol. 31, no. 2, pp. 366–374, 2010.
- [42] P. B. Shete, R. M. Patil, B. M. Tiwale, *et al.*, "Water dispersible oleic acid-coated Fe_3O_4 nanoparticles for biomedical applications," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 377, no. February, pp. 406–410, 2015.
- [43] D. M. Furlan, "Ésteres de celulose: síntese e posterior preparação de filmes com incorporação de nanopartículas de magnetita," Universidade de São Paulo, 2014.
- [44] P. Burnham, N. Dollahon, C. Li, *et al.*, "Magnetization and Specific Absorption Rate Studies of Ball-Milled Iron Oxide Nanoparticles for Biomedicine Magnetization and Specific Absorption Rate Studies of Ball-Milled Iron Oxide Nanoparticles for Biomedicine," *J. Nanoparticles*, 2013.
- [45] A. F. R. Robalo, "Desenvolvimento de microgéis híbridos para a sua aplicação em tratamentos de hipertermia magnética," Universidade Nova de Lisboa - FCT, 2014.
- [46] D. K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, *et al.*, "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles," *Magn. Magn. Mater.*, vol. 225, pp. 30–36, 2001.
- [47] B. Tarus, N. Fadel, A. Al-oufy, *et al.*, "Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats," *Alexandria Eng. J.*, vol. 55, no. 3, pp. 2975–2984, 2016.
- [48] A. C. B. Baptista, "Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de electofiação," Universidade Nova de Lisboa - FCT, 2009.

- [49] B. Rum, N. E. C. Hodur, A. N. L. Iccardo, *et al.*, "Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros," *Pesqui. em Geociências*, vol. 30, no. 2, pp. 3–15, 2003.
- [50] J. D. S. Martins, "Membranas Compósitas de Policaprolactona / Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica," Universidade Nova de Lisboa - FCT, 2011.
- [51] G. Ge, H. Wu, F. Xiong, *et al.*, "The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 215, pp. 1–10, 2013.
- [52] Y. Ge, Y. Zhang, J. Xia, *et al.*, "Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro," *Colloids Surfaces B*, vol. 73, no. 2, pp. 294–301, 2009.
- [53] A. K. Hauser, R. J. Wydra, N. A. Stocke, *et al.*, "Magnetic Nanoparticles and Nanocomposites for Remote Controlled Therapies," *Control Release*, vol. 219, pp. 76–94, 2015.